

Міністерство освіти і науки України
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

ПРАКТИКУМ З МІКРОБІОЛОГІЇ

Методичні рекомендації
для студентів 2 курсу денного відділення біологічного факультету

4-те видання, доповнене

Харків – 2016

Рецензенти:

В. П. Комариста – кандидат біологічних наук, доцент кафедри ботаніки та екології рослин Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна;

С. М. Шамрай – кандидат біологічних наук, доцент кафедри мікології та фітоімунології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

*Затверджено до друку рішенням Науково-методичної ради
Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна
(протокол № 1 від 16 жовтня 2013 року)*

Практикум з мікробіології : методичні рекомендації для студентів 2 курсу денного відділення біологічного факультету / уклад. О. І. Віннікова,

П 69 І. М. Раєвська. – 4-те вид., доп. – Х. : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2016. – 66 с.

Посібник містить методичні вказівки до загального курсу «Мікробіологія», що викладається на біологічному факультеті Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Для студентів і викладачів ВНЗ, коледжів, технікумів біологічного, фармакологічного, сільсько-господарського профілю. Для вчителів біології загальноосвітніх шкіл. Дані методичні рекомендації можуть використовуватися вчителями для проведення лабораторних робіт в спеціалізованих класах, в гуртках юних біологів.

**УДК 579 (076)
ББК 28.4я 73-5**

© Харківський національний університет
імені В. Н. Каразіна, 2016
© Віннікова О. І., Раєвська І. М., уклад., 2016
© Дончик І. М., макет обкладинки, 2016

ВСТУП

Програма загального курсу «Мікробіологія» передбачає висвітлення питань відкриття мікроорганізмів та роль провідних вчених у розвитку мікробіології. У межах курсу передбачається визначення місця прокаріотів у системі органічного світу та огляд сучасних проблем систематики мікроорганізмів. Значна частина курсу присвячена вивченню будови та функцій окремих структур прокаріотної клітини, росту та особливостям розмноження мікроорганізмів, їхнього конструктивного та енергетичного метаболізму, мінливості прокаріот. Важливе місце відводиться висвітленню поширення мікроорганізмів у природі, їх геохімічній ролі та участі у кругообігу речовин. Також певні питання стосуються використання мікроорганізмів у генній інженерії та біотехнології.

До кожного лабораторного заняття додається мікробіологічний словник. Терміни, що наводяться у ньому, є базовими для певної роботи, і студенти повинні записати їх тлумачення та запам'ятати. До кожного лабораторного заняття наводяться завдання, які студент повинен виконати до початку лабораторної роботи. Після кожної лабораторної роботи є перелік контрольних питань, на які студент повинен відповісти.

В кінці методичних рекомендацій наведені теми для самостійної роботи з курсу, рекомендована література та питання за темами, що виносяться на самостійне вивчення, а також контрольні питання з курсу «Мікробіологія».

1. ОСНОВИ МІКРОСКОПІЧНОЇ ТЕХНІКИ

1.1. Правила роботи з мікроскопом. Використання імерсійної системи мікроскопа

Мікроскоп – оптичний прилад, призначений для вивчення об'єктів, які невидимі для неозброєного ока. В мікробіологічній практиці мікроскоп використовують для вивчення форми та будови клітин мікроорганізмів, спостереження за їх ростом і розвитком. Як відомо, конструкція світлового мікроскопа складається з механічної частини (остов мікроскопа, предметний столик, тубусотримач, тубус, кронштейн для конденсора, револьвер об'єктивів, гвинт для переміщення конденсора, рукоятки мікро- та макрометричних гвинтів, клеми), оптичної частини (окуляр, об'єктиви, конденсор) і системи освітлення (дзеркало або освітлювач).

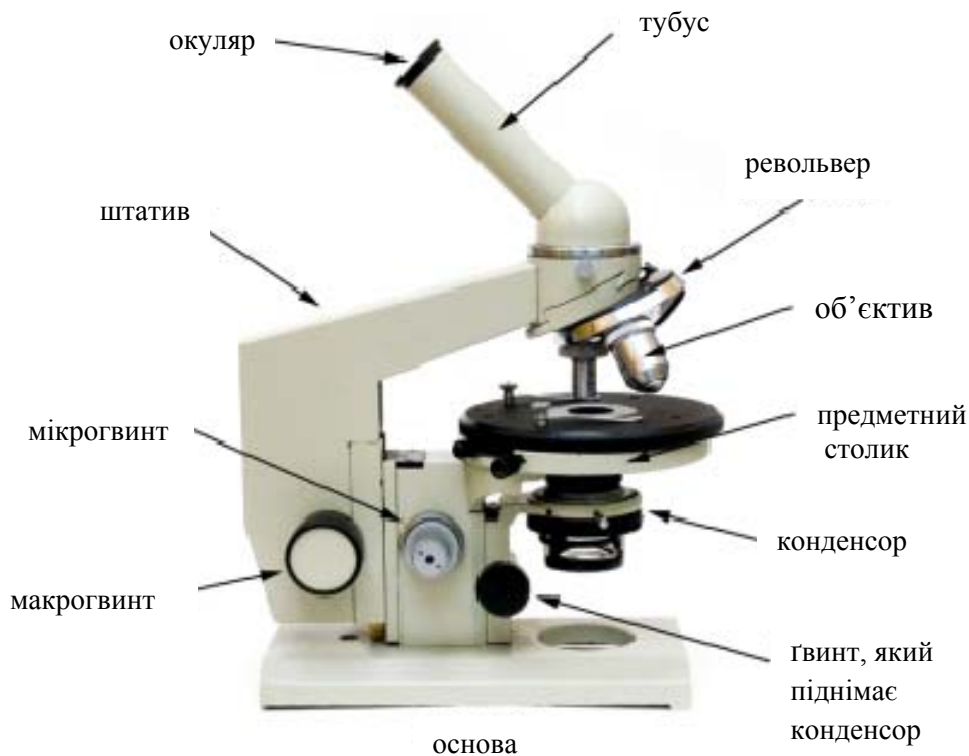


Рис 1. Улаштування мікроскопу «Біолам»

Окуляри мікроскопа складаються з двох лінз і відрізняються збільшенням (7х, 10х, 15х), яке обирають залежно від об'єкта дослідження.

Об'єктиви – багатолінзові системи, в яких нижня лінза (фронтальна, та, що звернута до об'єкта) дає збільшення, а інші лінзи використовуються для корекції зображення. Найчастіше у мікробіологічній практиці використовують: 8х (10х) – мале збільшення, 40х (60х) – середнє збільшення і 90х (100х) – велике збільшення. Чим більше збільшення об'єктива, тим менше повинна бути відстань від об'єкта до фронтальної лінзи (наприклад, 13.8мм для 8х і 0.12мм для 90х). Об'єктиви, в яких між фронтальною лінзою й об'єктом є повітря, називаються сухими, при роботі з ними частина світлових променів відхиляється та не потрапляє в око через різницю коефіцієнтів заломлення скла та повітря. Для зменшення кількості відхилених променів (і водночас покращення зображення об'єкта) використовують

імерсійні системи з об'єктивами, фронтальну лінзу яких можна занурювати в імерсійну рідину; такі об'єктиви мають чорну стрічку на металевій оправі. Імерсійні рідини (вода, гліцерин, кедрове, вазелінове або терпенове масло, монобромфталейн) мають коефіцієнти заломлення, наближені до показника заломлення скла (рис. 2).

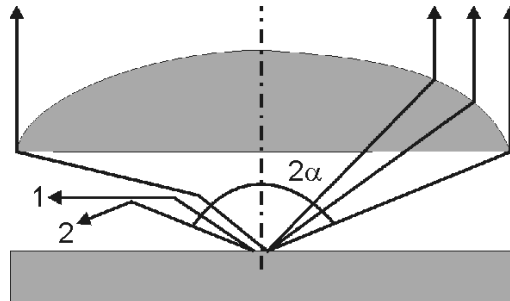


Рис. 2. Вплив імерсійної системи на числову апертуру об'єктива.

1.2. Порядок роботи з мікроскопом (при використанні імерсійної системи)

Для отримання достовірної інформації про тонку будову клітини мікроорганізму необхідно правильно виставляти освітлення об'єкта. Найбільш зручно для цього використовувати індивідуальні освітлювачі ОІ-31 або ОІ-32.

1. Встановити освітлювач у штатив мікроскопа й увімкнути.
2. Підняти тубус мікроскопа та встановити об'єктив 8х.
3. Підняти конденсор уверх до упору та повністю відкрити діафрагму конденсора.
4. Послабити гвинт, який тримає патрон освітлювача та плавними рухами повернути патрон, дивлячись у окуляр, візуально встановити максимальне освітлення та гвинтом закріпити патрон у даному положенні.
5. На абсолютно сухий препарат за допомогою скляної палички нанести 1-2 краплі імерсійного масла.
6. За допомогою клем закріпити препарат на предметному столику мікроскопа.
7. Прикрити діафрагму конденсора та, дивлячись в окуляр, за допомогою макрометричного гвинта встановити максимально чітке зображення рівномірно пофарбованої і тонкої ділянки мазка, предметне скло при цьому можна пересувати.
8. Не піднімаючи тубус, повернути револьвер і встановити об'єктив 90х, при цьому він повинен зануритися в імерсійне масло. Якщо цього не відбулося, опустити об'єктив у масло за допомогою макрометричного гвинта.
9. Повністю відкрити діафрагму конденсора та за допомогою мікрометричного гвинта встановити максимально чітке зображення об'єкта.
10. Для вивчення іншого об'єкта необхідно підняти тубус мікроскопа, перевести револьвер з об'єктивами на пусте гніздо, або на мале збільшення і тільки після цього встановити інший препарат.
11. Після роботи ватю, змоченою етиловим спиртом, зняти залишки масла з імерсійного об'єктива.

2. ПРИНЦИПИ ОРГАНІЗАЦІЇ ТА ОСОБЛИВОСТІ РОБОТИ В МІКРОБІОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

ЗАНЯТТЯ 1. Структура мікробіологічної лабораторії. Живильні середовища для вирощування мікроорганізмів. Стерилізація та дезінфекція

Мікробіологічний словник:

Посів, інокуляція (inoculation)

Пересів (transfer)

Інкубація культури (incubation of cultures)

Культура бактерій (bacterial culture)

Чиста (аксенічна) культура (pure (axenic) culture)

Змішана культура (mixed culture)

Накопичувальна культура (enrichment culture)

Поживне середовище (culture medium)

1.1. Улаштування мікробіологічної лабораторії

Мікробіологічна лабораторія повинна складатися як мінімум з чотирьох приміщень:

1. Кімната, в якій проводять попередню підготовку матеріалу й обладнання для проведення мікробіологічних дослідів.
2. Кімната для роботи з чистими культурами мікроорганізмів – бокс.
3. Автоклавна – спеціально обладнане приміщення, де проводиться стерилізація матеріалу та живильних середовищ.
4. Мийна кімната. Мікробіологічна лабораторія повинна бути укомплектована приладами й обладнанням, необхідним для роботи з різними групами мікроорганізмів з урахуванням особливостей їх біології, а також для проведення дослідів і виконання мікробіологічних аналізів різних матеріалів.

Мінімальний набір приладів і обладнання для повноцінного функціонування лабораторії мікробіологічного профілю

Прилад	Призначення
Автоклав	
Сухо-жарова шафа	
Термостат	

Мікроанаеростат	
Ламінар	
Водяна баня	
Люміностантна камера	
Терези	
Електричні шейкери	



Посуд: мікробіологічні пробірки (*test tub*), колби (*flask*), циліндри (*graduated cylinder*) різної форми й об'єму, піпетки (*pipette*) різного об'єму, чашки Петрі (*petri dishes or plat*) різного діаметра, скляні лійки, предметні скельця з лункою та без – всі ці предмети повинні бути виготовлені з термостійкого скла, оскільки підлягають нагріванню.

Предмети: бактеріальні петлі (*loop*), голки, шпатель металеві і скляні; ватно-марлеві та гумові пробки; засоби для фільтрування (прибор Зейтца, бактеріальні фільтри різної конструкції тощо).

Якщо використовується одноразовий пластиковий мікробіологічний посуд (пробірки, піпетки, чашки Петрі), необхідно мати спеціальне обладнання для його дезінфекції та утилізації.

1.2. Живильні середовища для вирощування мікроорганізмів

Будь-який організм для росту та розвитку повинен отримувати з оточуючого середовища усі речовини та компоненти, що необхідні йому для синтезу складових клітини й отримання нею енергії, і мікроорганізми не є з цього винятком. Тому у культуральному середовищі, в якому вирощуються мікроорганізми, повинні бути усі поживні речовини в достатній кількості для росту та розмноження мікроорганізмів з урахуванням потреб щодо кожного елемента. Оскільки вода складає до 85 % клітини, необхідною є присутність даної

речовини у достатній кількості. Також необхідними компонентами поживного середовища для мікроорганізмів є вуглець, азот, фосфор, сірка, калій і натрій, оскільки на долю цих елементів приходить до 95 % сухої маси клітин. Окрім того, майже усім мікроорганізмам потрібні кальцій, залізо, магній, хлор, цинк, мідь та деякі інші елементи, цю групу елементів у рецептах живильних середовищ називають мікроелементами. Зазвичай усі необхідні метали мікроорганізми отримують у вигляді катіонів неорганічних сполук, якщо середовище готують на відстояній та кип'яченій воді, мікроелементи можна не додавати, оскільки вони у слідовій кількості входять до складу водопровідної води.

Залежно від способу життєдіяльності мікроорганізми повинні отримувати вуглець, азот і сірку в певній хімічній формі. Так, для автотрофів вуглець необхідно давати у вигляді CO₂, для гетеротрофів – у вигляді певних органічних сполук; азот і сірку – у вигляді амінокислот або продуктів первинного розпаду білків – пептонів, а для окремих груп мікроорганізмів – азот і сірка повинні поставлятися у вигляді неорганічних сполук – молекулярного азоту, нітратів, аміаку, сульфатів, сірководню тощо. Також для окремих груп мікроорганізмів необхідні фактори росту (органічні сполуки, які використовуються як попередники синтезу інших речовин, компонентів клітини) – амінокислоти, пурини та піримідини, вітаміни. Оскільки організми поділяються на аеробні й анаеробні, для перших необхідна присутність у середовищі кисню, а для других, навпаки, необхідно скласти безкисневі умови вирощування.

Живильні середовища, які використовують для вирощування мікроорганізмів із різними способами життєдіяльності, поділяють на групи.

Назва	Склад	Приклад
За складом		
<u>Природні</u>		
<u>Синтетичні</u>		
<u>Напівсинтетичні</u>		
За консистенцією		
<u>Рідкі</u>		
<u>Тверді</u>		
За призначенням		
<u>Середовище збагачення</u>		

<u>Елективні, селективні</u>		
<u>Диференційно- діагностичні</u>		

У мікробіологічній практиці часто використовують такі живильні середовища: м'ясна вода (настій свіжого подрібненого м'яса на водопровідній воді), м'ясо-пептонний бульйон – МПБ (відвар свіжого подрібненого м'яса, або суміш м'ясної води з пептоном і NaCl), м'ясо-пептонний агар (суміш МПБ і агар-агару), м'ясо-пептонна желатина (суміш МПБ і желатини), сусло-агар (суміш неохмеленого пивного сусла й агар-агару), середовища Чапека, Бредмана, Мейєра, Гетчинсона (мінеральні середовища), а також молочна, картопляна вода, шматочки стерильних овочів, натуральні соки.

1.3. Стерилізація та дезінфекція. Методи стерилізації

Стерилізація (*від лат. sterilis – безплідний*) – повне знищення усіх живих мікроорганізмів у різних матеріалах, середовищах, предметах. Стерильність – відсутність мікроорганізмів у середовищі, об'єкті, організмі.

Методи стерилізації поділяють на теплові (проводять при підвищеній температурі) та холодні (без нагрівання).

Назва методу	Режим стерилізації	Предмети для стерилізації
<u>Теплові методи</u>		
стерилізація кип'ятінням		
стерилізація парою під тиском (автоклавування)		
стерилізація текучою парою (тиндалізація)		
стерилізація сухим жаром (в сухо-жарових шафах)		
стерилізація в полум'ї газового пальника або спиртівки (фламбування)		
пастеризація (неповна стерилізація)		

<u>Холодні методи</u>		
<u>фізичні:</u> УФ або γ -промені		
мембранна фільтрація (бактеріальні фільтри)		
<u>хімічні:</u> хімічні речовини: епоксид етилену (EO - ethylene oxide)		

Для матеріалів, обладнання, поживних середовищ, що використовуються при проведенні мікробіологічних аналізів, застосовують певні методи стерилізації залежно від виду обладнання та хімічного складу розчинів. Наприклад, металеві предмети, що мають різку поверхню, не можна кип'ятити, гумові пробки не можна стерилізувати у сухо-жаровій шафі, поживні середовища, які містять високу концентрацію цукрів не можна автоклавувати, оскільки цукри карамелізуються і таке середовище буде не придатним для використання.

Дезінфекція (від *фр. des – від + лат. infecere – заражати, псувати*) – знищення організмів, у т. ч. мікроорганізмів, здатних викликати хворобу спеціальними засобами (хімічними, фізичними, біологічними). Дезінфекційні заходи використовують за умов роботи з патогенними або умовно-патогенними мікроорганізмами.

Дезінфектанти можуть чинити на клітини -цидну (бактерицидну, фунгіцидну, віруліцидну) або -статичну (бактеріостатичну, фунгістатичну, вірулістатичну) дію.

Заповніть таблицю:

Назва дезінфектанта	Механізм дії дезінфектанта	Використання дезінфектанта
Етиловий спирт		
Хлорамін Б		
Гіпохлорит натрію		
Четвертинні солі амонію (quats)		
Препарати йоду		

Феноли (фенол, бензоати, саліцилати, тощо)		
Формальдегід (формалін)		
Озон		

Контрольні питання

За якої температури відбувається плавлення та застигання агаризованих поживних середовищ?

У яких випадках доцільним є використання пастеризації та тиндалізації?

З якою метою використовують мембранні фільтри (фільтр Зейтца)?

Які фактори можуть впливати на активність дезінфектантів?

Які клітини мають високу резистентність до дії дезінфектантів? Чому?

Що таке асептика (асептична техніка у мікробіологічних дослідженнях) та антисептика?

2. ЦИТОЛОГІЯ ПРОКАРІОТ

ЗАНЯТТЯ 2. Морфологія бактерій. Виготовлення фіксованих забарвлених мікробіологічних препаратів

Мікробіологічний словник:

Мазок (smear)

Фіксування мазка (fixation of smear)

Анілінові барвники (aniline dyes)

Просте забарвлення (simple stain)

Скошена культура (slant culture)

Імерсійна система (oil immersion)

2.1. Форми клітин прокаріот

Існує три основні морфологічні типи прокаріот: одноклітинні, умовно багатоклітинні та багатоклітинні комплекси.

Найбільш поширені форми клітин прокаріот – куляста, паличкоподібна та звивиста, їх описав у XVII столітті Антоній Ван Левенгук. На сьогодні відомі наступні форми бактеріальної клітини: кулясті (коки) розподіляються на мікрококи (після розподілу розходяться, агрегацій не утворюють), диплококи (з'єднані попарно), тетракоки (з'єднані по 4), стрептококи (утворюють ланцюжки різної довжини), стафілококи (утворюють агрегації у вигляді виноградного грона) та сарцини (утворюють пакети з 8–16–32 клітин); паличкоподібні (циліндричні) – довжина клітини у кілька разів перевищує ширину, можуть мати загострену, закруглену, зрізану форму закінчень клітини, розподіляються на бактерії (не утворюють спор) і бацили (утворюють ендоспори), які можуть з'єднуватися попарно (диплобактерії, диплобацили) або утворювати ланцюжки різної довжини (стрептобактерії, стрептобацили); звивисті розподіляються на вібріони (мають вигляд коми), спірили (клітини мають 1–6 завитків), спірохети (мають більше 6 завитків); а також бактерії, які мають «незвичайну» форму клітини: тороїдні (форма зімкнутого або розімкнутого кільця); простекобактерії (мають вирости клітини); зіркоподібні, трикутні, квадратні. Також до незвичайних форм бактеріальних клітин можна віднести стебельцеві бактерії (рід *Caulobacter*), або бактероїди групи *Rhizobium* – V-, Y-подібна форма клітини однієї зі стадій розвитку.

Умовно багатоклітинними формами є представники нитчастих бактерій. Зараз дискутується питання щодо істинної багатоклітинності ціанобактерій (ботан. – синьозелені водорості). Прикладами нитчастих прокаріот є залізобактерії, нитчасті безбарвні сіркобактерії та ін.

Достатньо рідко в природі трапляються прокаріоти, що утворюють багатоклітинні комплекси. Найбільш відомий представник такого морфологічного типу – метаносарцини, у яких під білковою оболонкою розташовані клітини основного виду та значно менші за розміром клітини-супутники, при цьому культивувати окремо ці бактерії неможливо.

2.2. Техніка виготовлення мікробіологічного препарату

Під час виконання лабораторних робіт необхідно дотримуватися певних правил з техніки безпеки при роботі з живими культурами мікроорганізмів, а саме:

- відкривати та закривати пробірку з мікроорганізмами необхідно виключно у полум'ї пальника;
- під час виготовлення препарату пробку необхідно затиснути водночас мізинним і безіменним пальцями, а не затискати пробку між ними;
- відкриту пробірку з мікроорганізмами необхідно тримати за полум'ям пальника, нахилену під невеликим кутом, отвором униз;
- під час виготовлення препарату предметне скло тримати виключно за грані;
- скло з незафіксованими мікроорганізмами повинно знаходитися виключно за полум'ям пальника;
- залишки культури мікроорганізмів на бактеріальній петлі після виготовлення мазка спалити у полум'ї пальника та ретельно простерилізувати усю петлю;
- не тримати на робочому столі сторонніх предметів;
- після закінчення роботи ваткою, змоченою 70 % етиловим спиртом, протерти поверхню стола та вимити руки з милом.

Для вивчення форми прокаріотної клітини найчастіше використовують метод фіксованих забарвлених препаратів. Виготовлення мікробіологічного препарату даним методом включає низку послідовних операцій:

1. Виготовлення мазка. На чисте знежирене предметне скло нанести невелику краплю дистильованої води, в неї за допомогою стерильної бактеріальної петлі внести невелику кількість маси мікроорганізмів і розподілити по поверхні скла. Мазок повинен бути тонким, діаметром близько 1 см. Якщо культура мікроорганізмів вирощувалася на рідкому живильному середовищі, за допомогою стерильної піпетки на чисте знежирене предметне скло наносять невелику краплю культуральної рідини, яка містить мікроорганізми. Краплю, яка містить мікроорганізми, можна розподілити по склу за допомогою стерильної бактеріальної петлі, або розподілити за допомогою грані іншого предметного (покривного) скла.

2. Висушування мазка. Проводять без нагрівання, при кімнатній температурі до повного випаровування води з поверхні предметного скла.

3. Фіксація мазка. Проводиться з метою: а) вбити мікроорганізми, щоб зробити безпечною подальшу роботу з ними; б) прикріпити мазок до поверхні скла, щоб він не змився при подальших маніпуляціях; в) зруйнувати поверхневі структури клітини для полегшення проникнення барвників, що покращує забарвлення клітин. Зазвичай мазок фіксують у полум'ї пальника, при цьому скло тримають за грані, мазком угору і 3–4 рази проносять крізь полум'я. Для дослідження внутрішньоклітинних структур мікроорганізмів використовують більш м'яку фіксацію – етиловим спиртом (96 %), сумішшю етилового спирту й ефіру, ацетоном тощо.

4. Забарвлення мазка. Може бути простим (використовується один барвник) і диференціальним (використовується кілька барвників у певній послідовності). На охолоджений після фіксування мазок піпеткою наносять кілька крапель барвника (мазок повинен бути повністю вкритий шаром барвника), при цьому піпетка не повинна торкатися поверхні скла. Для кожного барвника існує свій час контакту з поверхнею зафіксованих клітин. У разі диференціального забарвлення барвники витримують на мазку вказаний у методиці час і змивають водою або певним розчином.

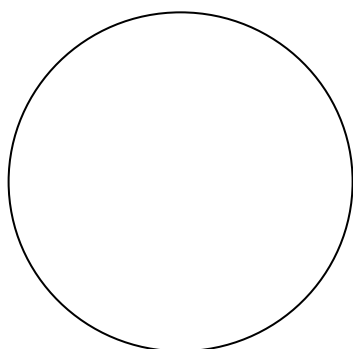
5. Промивання препарату. Проводять дистильованою водою до «чистої води», тобто з поверхні скла повинна стікати прозора вода, скло при цьому тримають під кутом, і струм води направляють безпосередньо на мазок. Барвник, який не поглинувся клітинами, змивається.

6. Висушування препарату. Промите скло ретельно витирають з нижнього боку клаптиками фільтрувального паперу, а з іншого боку – обережно промокають воду з залишками барвника та висушують на повітрі або над полум'ям пальника. У разі неякісного висушування скла погіршується якість зображення під мікроскопом.

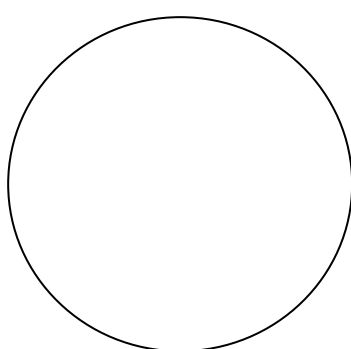
2.3. Дослідження морфології бактерій на прикладі *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* та *Sarcina flava*

Хід роботи

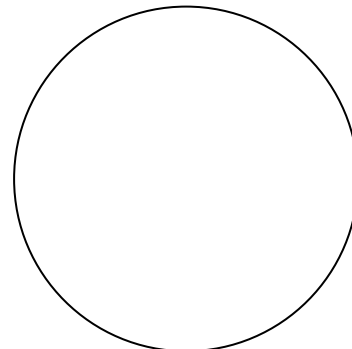
1. Виготовити мазок культури *Bacillus subtilis* (сінна паличка), висушити, зафіксувати у полум'ї пальника та забарвити простим способом барвником метиленовий синій (час контакту з клітинами – 3–5 хв.), промити водою та висушити.
2. Виготовити мазок культури *Staphylococcus aureus* (стафілокок золотистий) або *Sarcina flava* (сарцина жовта), висушити, зафіксувати у полум'ї пальника та забарвити простим способом барвником фуксин (час контакту з клітинами – 1–2 хв.), промити водою та висушити.
3. На обидва препарати нанести імерсійне масло та роздивитися за допомогою імерсійної системи мікроскопа.
4. Зробити схематичні малюнки досліджених мікроорганізмів.



Bacillus subtilis



Staphylococcus aureus



Sarcina flava

Контрольні питання

Які основні морфологічні типи прокаріот вам відомі?

З якою метою використовується бактеріальна петля?

Вкажіть, яким чином видаляють залишки культури мікроорганізмів з бактеріальної петлі?

Чому під час роботи з пробіркою її потрібно тримати у горизонтально над полум'ям?

Заповніть таблицю

Форма клітини прокаріот, малюнок	Представники	Форма клітини прокаріот, малюнок	Представники
Мікрококи		Стрептобактерії	
Диплококи		Стрептобацили	
Тетракоки		Вібріони	
Стрептококи		Спірили	
Стафілококи		Спірохети	
Сарцини		Тороїдні	
Диплобактерії		Простекобактерії	
Диплобацили		Зіркоподібні	

ЗАНЯТТЯ 3. Грампозитивні та грамнегативні бактерії

Мікробіологічний словник:

Посів «штрихом» (streak inoculation)

Поверхневий посів (surface plate inoculation)

Глибинний посів (pour plate method)

Пересів (transfer)

Диференціальне забарвлення (differential stains)

Пептидоглікан (муреїн) (peptidoglycans)

Прокаріотні мікроорганізми можна поділити на дві групи – грампозитивні та грамнегативні. Така назва з'явилася після запропонованого у 1884 р. Датським вченим Г.Грамом диференціального методу забарвлення бактерій, за яким одні бактерії забарвлюються у синьо-фіолетовий колір (грампозитивні), а інші бактерії забарвлюються у червоний або рожевий колір (грамнегативні). Сутність цього методу полягає в тому, що комплекс генціанового фіолетового барвника (генціан-віолет) з йодом після обробки мазка спиртом утримується клітинними покривами одних бактерій і вимивається з покривів інших, тому для їх визначення необхідно використовувати додатковий барвник, і для полегшення диференціювання обирають контрастний – червоний. Здатність забарвлюватися або не забарвлюватися у синьо-фіолетовий колір відображає фізичні властивості клітинної стінки мікроорганізмів.

Донедавна розглядалися різні теорії, що пояснюють диференційне забарвлення бактерій за Грамом (*Gram stain*) (наприклад, хімічна, мембранна, ізоелектрична). Згідно із сучасними уявленнями, після проникнення у клітини розчинна хлорна форма генціан-віолету переходить у нерозчинну йодну форму і випадає у осад, при цьому забарвлюється цитоплазма клітини. При обробці препарату розчинником (етиловий спирт, ацетон) із цитоплазматичної мембрани екстрагуються ліпіди, це призводить до підвищення її пористості. Таким чином, мембрана не є перешкодою для вимивання комплексу генціан-віолет-йод. Але зазвичай клітина має муреїновий шар (різної товщини та пористості у різних бактерій), який характеризується високою стійкістю до органічних розчинників. Багатошаровий малопористий муреїновий шар перешкоджає вимиванню барвника – клітини забарвлюються у синьо-фіолетовий колір (грампозитивно), а за наявності моношару муреїну із крупними порами клітини забарвлюються за Грамом негативно. Слід зауважити, що характер забарвлення прокаріот за Грамом залежить від віку культури, факторів зовнішнього середовища тощо.

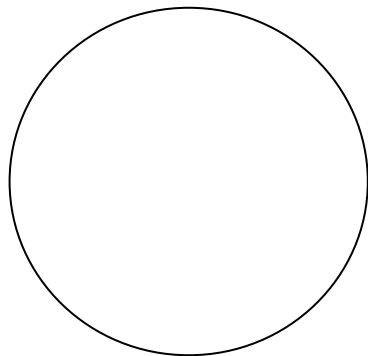
3.1. Диференціальний спосіб забарвлення бактерій за Грамом (класичний)

Класичний спосіб забарвлення, запропонований Грамом, був дороблений і модифікований багатьма вченими, існує навіть експрес-метод визначення грампозитивності в грамнегативності (жива культура грамнегативних бактерій утворює слиз при обробці 3 % КОН протягом 5–10 секунд).

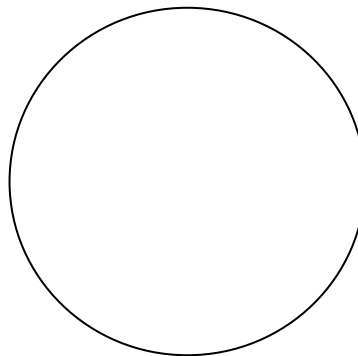
Хід роботи

1. На одному предметному склі по черзі приготувати мазки *Escherichia coli* (кишкова паличка) та *Bacillus mesentericus* (картопляна паличка).
2. На зафіксовані у полум'ї пальника мазки покласти невеликі клаптики фільтрувального паперу та нанести на нього генціановий фіолетовий барвник так, щоб папір повністю був зволожений барвником. У разі нещільного прилягання паперу до скла легко натиснути на папір бактеріальною петлею.
3. Через 5–6 (7) хв пофарбований папір зняти та забарвити препарати розчином Люголю – 1 хв, при цьому препарати потемніють.
4. Розчин Люголю злити й обробити препарати 96 % етиловим спиртом – 30–60 с (нанести кілька крапель спирту, зачекати 10–15 с, злити, процедуру повторити 2–3 рази залежно від товщини мазків та інтенсивності попереднього фарбування).
5. Препарати промити до «чистої води».
6. Дофарбувати препарати фуксином протягом 1–2 хв.
7. Барвник змити водою, препарати висушити та мікроскопіювати з імерсійним маслом.

8. Визначити, яка із запропонованих культур є грампозитивною, а яка – грамнегативною, якщо відомо, що *Bacillus mesentericus* – спороутворювальна бактерія, тому у полі зору будуть спостерігатися слабозабарвлені овальні тільца – спори, також бактерія утворює довгі ланцюги клітин. Кишкова паличка спор не утворює, зрідка в полі зору можуть траплятися короткі ланцюжки по 2–3 клітини.
9. Зробити схематичні малюнки досліджених мікроорганізмів.



Bacillus mesentericus



Escherichia coli

- 1 – вегетативні клітини
2 – спори

Контрольні питання

Дайте визначення поняттям «грампозитивні бактерії», «грамнегативні бактерії».

На якому етапі забарвлення за Грамом препарат промивають водою?

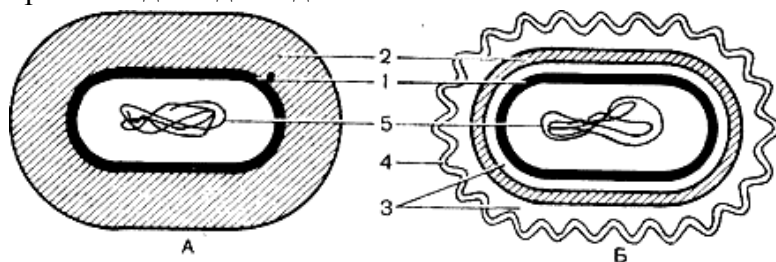
Коротко опишіть експрес-метод визначення типу клітинної оболонки бактерій.

Зафарбуйте клітини у відповідний колір на кожному етапі фарбування препарату за Грамом.

1. Генцианвіолет	2. Розчин йоду
3. Спирт	4. Фуксин

«+» – грампозитивні, «-» – грамнегативні

Зробіть відповідні підписи.



Будова клітинної стінки
грампозитивних (А)
та грамнегативних (Б) бактерій.

- 1 –
- 2 –
- 3 –
- 4 –
- 5 –

В який колір фарбуються грампозитивні та грамнегативні бактерії?

Яка клітинна структура перешкоджає вимиванню барвника з клітинних покривів бактерій?

Які речовини можуть бути основою клітинної стінки прокаріот?

Чому під дією пеніциліну та лізоциму бактеріальні клітини гинуть?

Що таке протопласт?

ЗАНЯТТЯ 4. Генетичний апарат бактеріальної клітини

Мікробіологічний словник:

Нуклеоїд (nucleoid)

Нуклеїдосома

Бактеріальна хромосома (bacterial chromosome)

Плазмід (plasmid)

Транспозон (transposon)

Як відомо, головна відмінність прокаріотних організмів від еукаріотів – відсутність оформленого ядра, але генетичний матеріал обох груп представлений ДНК. Структура, яка у прокаріот виконує функцію носія генетичної інформації, отримала назву нуклеоїда та зазвичай складається із замкненої в кільце молекули ДНК (бактеріальна хромосома), хоча інколи трапляються лінійні хромосоми. Бактеріальна хромосома компактно упакована, в ній можна виділити як суперспіралізовані, так і деспіралізовані ділянки ДНК; стабільність такої упаковки підтримується білками та молекулами РНК. В одній бактеріальній клітині може налічуватися до 9 копій хромосоми, але нуклеоїд в клітині один.

Окрім нуклеоїда, в клітинах прокаріот можна спостерігати необов'язкові структури, бактеріальні плазміді – невеликі, замкнені в кільце, рідше – лінійні, ділянки ДНК. Плазміді

не зв'язані з нуклеїдом та несуть інформацію про додаткові властивості організму й при діленні бактерій передаються до однієї з дочірніх клітин. Найбільш поширеними у прокаріот є плазміді стійкості до антибіотиків та інших хімічних речовин (F-плазміді, R-плазміді, Col-плазміді, D-плазміді, Ti-плазміді, плазміді-фаги).

4.1. Фарбування ядерних елементів методом Романовського–Гімза

Оскільки прокаріотні клітини мають достатньо малі розміри, для полегшення процедури мікроскопіювання генетичного матеріалу рекомендується забарвлювати ядерний матеріал еукріотного мікроорганізму, наприклад, дріжджів.

Хід роботи

1. Виготовити мазок *Saccharomyces cerevisiae* та висушити при кімнатній температурі.
2. Зафіксувати мазок у рідині Карнуа протягом 15 хв.
3. На висушений фіксований мазок нанести барвник Романовського–Гімза та витримати 40–45 хв. в термостаті при температурі 37°C.
4. Препарат промити водою, висушити фільтрувальним папером і мікроскопіювати з імерсійним маслом.
5. Знайти в полі зору овальні клітини, в яких цитоплазма забарвлена у рожевий колір, а ядерний матеріал – у фіолетовий.
6. Зробити схематичний малюнок з позначенням ядерного матеріалу.

4.2. Вимірювання розмірів клітин

Для визначення розмірів клітини використовують об'єкт-мікрометр та окуляр-мікрометр.

Окуляр-мікрометр. Окуляр-мікрометр є круглою скляною пластинкою, в центрі якої знаходиться лінійка довжиною 5 мм. Лінійка розділена на 50 частин. Окулярний мікрометр вставляють в окуляр.

Об'єкт-мікрометр. Об'єкт-мікрометр – це металічна пластина зі склом, на якому нанесено лінійку довжиною 1 мм. Вона розділена на 100 частин, тобто поділка об'єкт-мікрометра складає 0,01 мм, або 10 мкм. Для визначення ціни поділки окулярного мікрометра об'єктивний мікрометр поміщають на столик мікроскопу й фокусують при малому збільшенні (рис. 3). Зображення лінійки переміщують в центр поля зору і тільки після цього змінюють об'єктив на той, при якому будуть визначатися розміри клітин. Переміщуючи столик мікроскопу і повертаючи окуляр, встановлюють мікрометри так, щоб їх шкали були паралельні і одна перекривала іншу. Для визначення ціни поділки окулярного мікрометра суміщають одну поділку шкали окулярного і об'єктивного мікрометрів і знаходять наступну їх поділку, що співпадає (рис. 4).

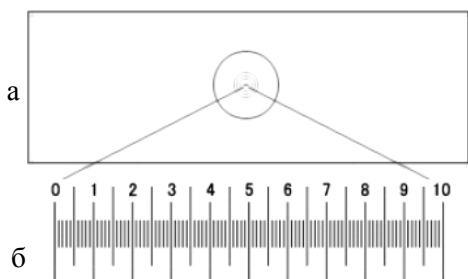


Рис. 3. Об'єкт-мікрометр.
а – загальний вид;
б – вид під мікроскопом

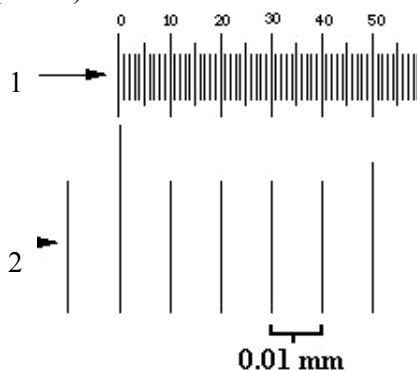


Рис. 4. Визначення ціни поділки окуляр-мікрометра.
1 – об'єкт-мікрометр;
2 – окуляр-мікрометр

Встановлюють, скільком поділкам об'єкт-мікрометра відповідає одна поділка окуляр-мікрометра. Наприклад, дві поділки об'єкт-мікрометра (20 мкм) відповідають п'яти поділкам окуляр-мікрометра, тобто, одна поділка окуляр-мікрометра дорівнює 4 мкм (20:5). Якщо тепер на предметний столик мікроскопа помістити препарат з клітинами мікроорганізму і роздивлятися його при тому ж збільшенні, то можна визначити розміри клітини. Для цього визначають, якому числу поділок окулярної лінійки відповідає величина об'єкта, що вимірюється, і помножують це число на ціну поділки окулярного мікрометра.

Saccharomyces cerevisiae:

1 – ядро

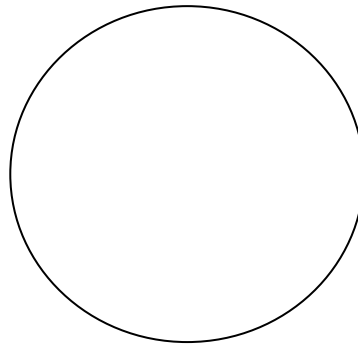
2 – цитоплазма

3 – клітинна стінка

Розміри клітини:

l =

d =



Контрольні питання

Порівняйте рибосоми прокаріот та еукаріот. Заповніть таблицю.

Ознака	Бактерії	Археї	Еукаріоти
Коефіцієнт седиментації			
Велика субодиниця (L)			
Маленька субодиниця (S)			
Типи РНК			
Кількість білків			
Локалізація			

Які відмінності набору ферментів, що беруть участь у реплікації ДНК у бактерій, архей та еукаріот?

Які відмінності набору ферментів, які беруть участь у транскрипції РНК у бактерій, архей та еукаріот?

Що таке «бактеріальна хромосома», яка вона може бути за структурою?

Скільки копій бактеріальної хромосоми може налічуватися в клітині?

Порівняйте клітини прокаріот та еукаріот. Заповніть таблицю.

Ознака	Бактерії	Археї	Еукаріоти
Мітоз (+/-)			
Редукційний поділ (+/-)			
Хромосома (кільцева, лінійна)			
Статевий процес (+/-)			
«Горизонтальний» перенос генів (+/-)			

ЗАНЯТТЯ 5. Клітинні включення мікроорганізмів

Мікробіологічний словник:

До внутрішньоклітинних включень мікроорганізмів належать запасні речовини (глікоген, крохмаль, гранульоза, волютин, білкові кристали, жири, сірка, ціанофіцинові гранули у ціанобактерій) та продукти метаболізму (зазвичай нерозчинні).

Заповніть таблицю:

Назва	Склад	Функція	Приклади мікроорганізмів
<u>Поліфосфатні гранули</u> (інші назви: запасні поліфосфати, волютин, метахроматинові зерна, тільця Бабеша-Ернста)			
<u>Запасні полісахариди</u> (поліглюкозиди, α -гранули)			
<u>Жироподібні речовини</u> (β -поліоксимасляна кислота – β -ПОМК та інші полігідрокси- алканоати (англ. PHA))			
<u>Білкові кристали</u> (параспоральні тільця)			

<u>Молекулярна сірка</u>			
<u>Цианофіцинові гранули</u>			

5.1. Забарвлення волютину

Хід роботи

1. Виготовити мазок *Rhodotorula sp.*, висушити та зафіксувати в полум'ї пальника.
2. На фіксований мазок нанести синьку Леффлера на 5–6 хв.
3. Препарат промити водою, висушити фільтрувальним папером і мікроскопіювати.
4. Знайти в полі зору овальні клітини, в яких цитоплазма забарвлена в бузково-блакитний колір, а зерна волютину – в червоно-фіолетовий.
5. Зробити схематичний малюнок з позначенням зерен волютину.

5.2. Забарвлення глікогену

Хід роботи

1. Виготовити мазок *Bacillus subtilis* і висушити при кімнатній температурі.
2. Мазок зафіксувати 96 % етиловим спиртом, для цього на сухий мазок нанести кілька крапель спирту та дочекатися повного його випаровування.
3. На фіксований спиртом мазок нанести 1–2 краплі розчину Люголю, накрити покривним склом, залишки рідини видалити фільтрувальним папером і через 10 хв препарат мікроскопіювати з імерсією.
4. Знайти в полі зору забарвлені в жовтувато-зеленуватий колір палички, в середині яких знаходяться гранули глікогену, забарвлені в коричнево-бурий колір.
5. Зробити схематичний малюнок з позначенням гранул глікогену.

5.3. Забарвлення жирів

Хід роботи

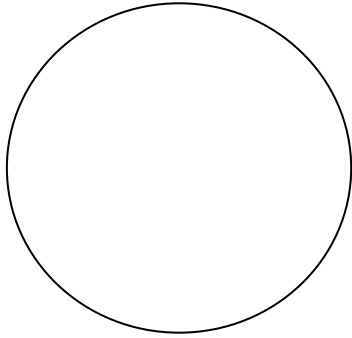
1. На предметне скло нанести невелику краплю рідкої культури *Saccharomyces cerevisiae*, яка була вирощена в умовах надлишку вуглецю.
2. Додати краплю барвника судан III і перемішати бактеріальною петлею.
3. Краплю накрити покривним склом і через 10–15 хв мікроскопіювати з імерсією.
4. Знайти в полі зору кулясті клітини, в яких цитоплазма безбарвна, а овальні тільця ліпідів набули оранжево-червоного кольору.
5. Зробити схематичний малюнок з позначенням жирових включень.

5.4. Забарвлення білкових кристалів

Хід роботи

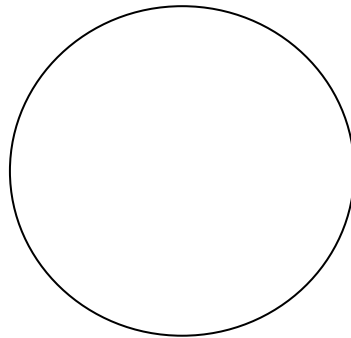
1. Виготовити мазок *Bacillus thuringiensis* і зафіксувати у полум'ї пальника.
2. Зафіксований мазок забарвити фуксином протягом 2–3 хв
3. Препарат промити водою, висушити фільтрувальним папером і мікроскопіювати з імерсією.

4. Зробити схематичний малюнок з позначенням параспоральних тілець.



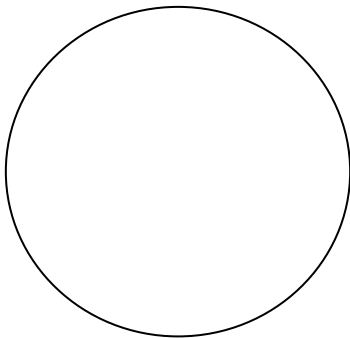
Rhodotorula sp.

1 – волютин



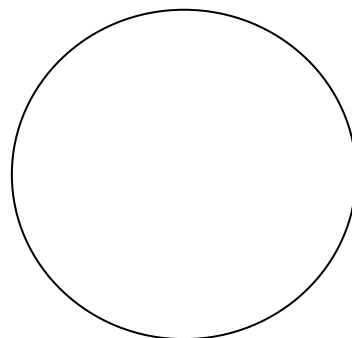
Bacillus subtilis

1 – глікоген



Saccharomyces cerevisiae

1 – жири



Bacillus thuringiensis

1 – білкові кристали

Контрольні питання

Назвіть шляхи використання поліфосфатів та мікроорганізмів, які їх утворюють.

Назвіть перспективні шляхи використання β -ПОМК та інших РНА прокаріот.

ЗАНЯТТЯ 6. Рухливість бактерій. Капсули. Ендоспори бактерій

Мікробіологічний словник:

Джгутик (*flagellum*)

Периплазматичний джгутик (*periplasmic flagellum*)

Стебельця (*stalk*)

Простеки (*prosthecae*)

Пілі, фімбрії (*pili or fimbriae*)

F-піля (sex pilus)

Капсула (capsule)

Чохол (cover)

Ендоспори (endospore)

Цисти (microbial cyst)

6.1. Рухливість бактерій

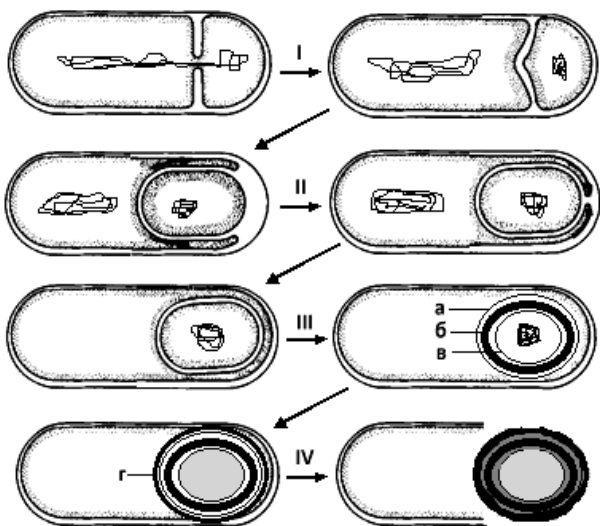
Бактерії розподіляються на рухомі (представники родів *Vibrio*, *Proteus*, *Sphaerotilus*, *Leptothrix*, *Spirochaeta*) і нерухомі (наприклад, види родів *Staphylococcus*, *Shigella*, *Klebsiella*). До руху здатні бактерії, що мають джгутики (плаваючий рух) і бактерії, позбавлені джгутиків, але здатні пересуватися іншим способом, наприклад, при контакті зі щільним субстратом (ковзний тип руху). Здатність бактерій до активного руху була описана у 1676 р. А. Левенгуком, а у 1876 р. Р. Кох сфотографував джгутики та запропонував метод їх фарбування. Джгутиковий апарат бактерій складається з білкових структур – нитки, крюка та базального тільця. Нитка джгутика виступає над поверхнею бактеріальної клітини, далі біля поверхні клітини вона приєднується до крюка, який з'єднується з базальним тільцем, що повністю занурене в клітинні покриви та частково – у цитоплазму. До складу базального тільця входить вісь із нанизаними на неї кільцями – у грамнегативних бактерій це кільце L (вбудоване у зовнішню мембрану), кільце P (знаходиться в муреїновому шарі), MS-кільце (інтегроване в ЦПМ) і кільце C (частково інтегроване в ЦПМ, частково – занурене в цитоплазму). Також базальна структура має секреторну систему, по якій експортуються білкові субодиниці для збірки джгутикового апарату. Функцією перших двох кілець є підтримка осі базальної структури. Кільце MS є елементом, до якого прикріплюються субодиниці осі, ротора, перемикача напрямку оберту та компоненти експортного апарату. C – кільце виконує функцію перемикача напрямку оберту клітини. У грампозитивних бактерій відсутні L і P кільця. Рух джгутиків виконується завдяки «мотору», що входить до складу базального тільця, а саме завдяки його основному компоненту – ротору, який локалізований в MS-кільці. Оберт ротора «мотора» забезпечується трансмембранною протонрушійною силою (або, як виключення, енергією градієнта катіонів натрію), енергія АТФ при цьому не витрачається. Але енергія АТФ витрачається на побудову компонентів джгутикового апарату та на роботу регуляторних систем клітини, які забезпечують оберти джгутика – за годинниковою стрілкою або проти.

6.2. Ендоспори бактерій

До спороутворення здатна невелика кількість бактерій. Ендоспори утворюють представники невеликої кількості родів (близько 10) і переважно з циліндричною формою клітини, наприклад бактерії родів *Bacillus*, *Clostridium*, *Amphibacillus*, *Sulfobacillus*, як виняток – спороутворювальні бактерії роду *Sporosarcina* мають кулясту форму клітин. Спори бактерій, на відміну від спор еукаріот, не є способом розмноження, вони формуються ендогенно, тобто всередині материнської клітини та можуть мати центральне, субтермінальне (прикінцеве) або термінальне (кінцеве) положення. Діаметр спори може не перебільшувати ширину материнської клітини (бацилярний тип при центральному або субтермінальному положенні), а може перебільшувати (кlostридіальний тип при центральному або субтермінальному

положенні, плектридіальний тип – при термінальному положенні). Раніше вважалося, що у бактерій спори утворюються виключно у відповідь на виникнення несприятливих умов середовища, зараз же більшість вчених схиляється до думки, що ендоспори – це один з етапів розвитку популяції, хоча ця стадія не обов'язкова. Ендоспори, на відміну від вегетативних клітин бактерій, більш стійкі до підвищеної температури (навіть до 140°C), опромінення та дії хімічних речовин. Спори містять воду, яка знаходиться у зв'язаному стані, раніше ж вважалося, що спори майже не містять води. Термореزистентність спор пов'язують із умістом дипіколінової кислоти, якої немає у вегетативних клітинах; стійкість до дії хімічних речовин і опромінення пояснюється багат шаровими оболонками.

Спороутворення контролюється більш ніж 150 генами, причому кожен з етапів утворення спор контролюється певними оперонами. Процес спороутворення починається з ущільнення цитоплазми навколо нуклеоїда, далі починається процес утворення преспори, при цьому цитоплазматична мембрана інвагується, та в результаті під клітинною стінкою утворюються різні за розмірами дві структури, що оточені мембранами (I). На наступному етапі (II)



цитоплазматична мембрана більшої частини оточує меншу частину – формується преспора (структура, оточена подвійною мембраною всередині материнської клітини). Далі обидві мембрани (III, а і в) починають синтез оболонки спор, а у більшості видів проміж мембран формується ще одна оболонка – кортекс (III, б). Окрім кортекса, формуються внутрішня та зовнішня оболонки спор (IV, г), а також екзоспориум. Після того, як спора повністю сформувалася, настає лізис материнської клітини (IV). Період спокою бактеріальних спор може тривати від кількох годин до сотень років.

Рис. 5. Спороутворення у бактерій

6.3. Спостереження за рухом бактерій

Дослідити джгутики бактерій у світловий мікроскоп досить складно, це пов'язано з їхнім розміром (довжина – до 15 мкм, а діаметр – 12–18 нм). Простіше спостерігати рух живих бактерій у рідкому середовищі.

6.3.1. Виготовлення накопичувальної культури маслянокислих бактерій

Маслянокислі бактерії (представники р. *Clostridium*) зброджують вуглеводи та деякі органічні кислоти до масляної й ацетатної кислот, H_2 і CO_2 . Клостридії – рухомі (перитрихи) анаеробні бактерії, що мешкають у ґрунті й утворюють спори за клостридіальним або плектридіальним типом.

Хід роботи

1. Подрібнити нечищену сиру картоплю.
2. Пробірку заповнити шматочками сирі картоплі на 1/3.
3. Для нейтралізації середовища додати невелику кількість крейдового порошку.
4. Суміш залити водопровідною водою, перемішати, закрити пробкою.
5. Пробірки пастеризувати на водяній бані при 80°C протягом 20 хв.
6. Після пастеризації пробірки поставити у термостат при температурі 30°C на кілька днів.

6.3.2. Виготовлення препаратів «роздавлена крапля» і «висяча крапля»

Дані типи препаратів використовують для спостереження за живими бактеріями, в тому числі, рухомими. Для виготовлення таких препаратів використовують знежирені предметні та покривні скельця, а також предметні скельця з лунками.

Метод «роздавленої краплі»

Хід роботи

1. На предметне скло за допомогою піпетки нанести невелику краплю рідини, яка містить бактерії, у даному випадку – бродильну рідину з клостридіями.
2. До краплі додати розчин Люголя та накрити покривним скельцем так, щоб під ним не було бульбашок повітря. Залишки рідини видалити фільтрувальним папером.
3. Препарат мікроскопіювати під об'єктивом 40х. У полі зору – рухомі паличкоподібні клітини жовтувато-зеленуватого кольору.
4. Зробити схематичний малюнок.

Метод «висячої краплі»

Хід роботи

1. На покривне скельце нанести невелику краплю рідини, яка містить бактерії.
2. По кутам покривного скла за допомогою препарувальної голки нанести невелику кількість вазеліну.
3. Покривне скло накрити предметним склом із лункою та легко натиснути на нього. Предметне скло з приклеєним до нього покривним обережно перевертають покривним склом угору. У разі правильного виготовлення препарату крапля не торкається стінок лунки, а завдяки силі поверхневого натягнення тримається на покривному склі та вільно провисає у лунці предметного скла.
4. Препарат мікроскопіювати під об'єктивом 40х. У полі зору – рухомі паличкоподібні клітини.

6.4. Спостереження капсули. Дослідження капсули *Azotobacter chroococcum*

Хід роботи

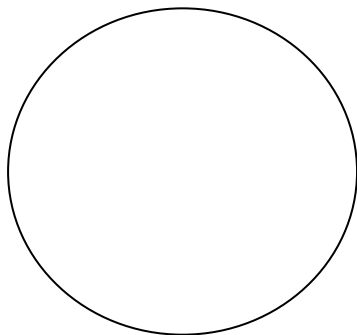
1. На добре знежирене предметне скло нанести невелику краплю метиленового синього барвника.
2. До барвника додати невелику кількість бактеріальної культури та ретельно перемішати за допомогою бактеріальної петлі.
3. За допомогою покривного скельця рідину розподілити по поверхні предметного скла й утворити тонкий мазок.
4. Препарат висушити при кімнатній температурі та мікроскопіювати з імерсійною системою.
5. Під мікроскопом на темному полі знайти майже незабарвлені кулясті клітини або диплококи. Незабарвлений шар навколо клітин – капсульна речовина, яка затримує барвник.
6. Зробити схематичні малюнки.

6.5. Ендоспори бактерій

Хід роботи

1. На фіксований мазок культури спороутворювальної бактерії *Bacillus subtilis*, *Clostridium* *sp.* нанести достатню кількість синьки Леффлера та довести барвник до кипіння у полум'ї пальника, при цьому предметне скло спочатку прогрівають над полум'ям по всій довжині, а потім затримують на кілька секунд над полум'ям так, щоб воно торкалося скла. Якщо скло було достатньо прогрітим, барвник закипає за 10–15 с. У випадку, коли скло було перегріте, барвник не кипить, а випаровується, при цьому скло не слід тримати в полум'ї більше 10 с. Після нагрівання скло не кладуть на холодні предмети, щоб запобігти його розтріскуванню.

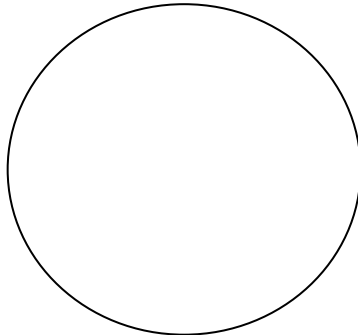
2. Препарат ретельно промити водою тільки після охолодження скла.
3. Вологий препарат дофарбувати барвником нейтральрот протягом 2–3 хв.
4. Препарат промити водою та висушити фільтрувальним папером.
Після такого способу забарвлення спори фарбуються в синьо-блакитний колір, а вегетативні клітини – у рожевий.
5. Під мікроскопом (використовувати імерсійну систему) у полі зору знайти окремі спори, вегетативні клітини та спори в середині вегетативних клітин. Зробити схематичні малюнки з позначенням спор і вегетативних клітин.



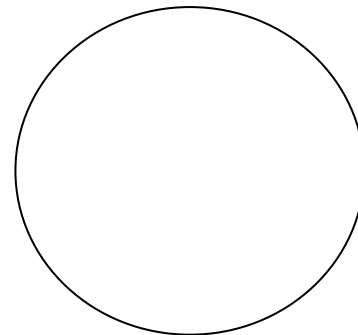
Azotobacter chroococcum

1 – клітина

2 – капсула



Clostridium sp.



Bacillus subtilis

1 – спори

2 – вегетативні клітини

3 – клітини зі спорами

Контрольні питання

Перерахуйте, які типи руху відомі у прокаріот (8 типів).

Чим відрізняються джгутики прокаріот та еукаріот?

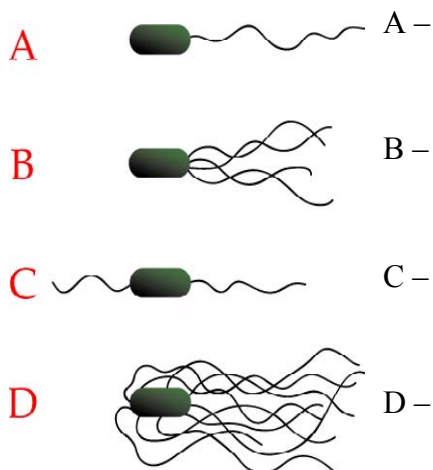
Що таке периплазматичний джгутик?

Чим різняться будова джгутиків у грампозитивних і грамнегативних бактерій?

Назвіть функції капсул?

З яких речовин може складатися капсула прокаріот?

Зробіть відповідні підписи:



Зробіть схематичний малюнок джгутика:



Зробіть підписи до рисунка:

Які цитологічні типи утворення ендоспор вам відомі? Замалюйте та підпишіть.

Рисунок					
Назва типу	бацилярний	параспоральний	плектридальний	кlostридіальний	латероспоральний
Назва виду бактерій					

Чим можна пояснити терморезистентність ендоспор? Запишіть структурну формулу речовини.

Зробіть схематичний малюнок ендоспори бактерій. Вкажіть її оболонки.



- 1 – кор (конденсовані цитоплазма та нуклеоїд)
- 2 – внутрішня (власна) мембрана спори
- 3 – примордіальний муреїновий шар
- 4 – кортекс
- 5 – зовнішня мембрана (материнської клітини)
- 6 – оболонки спори (декілька шарів)
- 7 – екзоспориум
- 8 – інші структури (елатери, шипи, тощо)

Чим відрізняється за будовою пептидоглікан, який входить до складу кортексу? Яке значення такого пептидоглікану?

3. ФІЗІОЛОГІЧНІ ГРУПИ ПРОКАРІОТ

ЗАНЯТТЯ 7. Біологічна фіксація азоту й азотфіксатори

Мікробіологічний словник:

Симбіоз (symbiosis)

Діазотрофія (nitrogen fixation)

Нітрогеназа (nitrogenase)

Леггемоглобін (leghemoglobin, leghaemoglobin, legoglobin)

Симбіотичні азотфіксатори (symbiotic nitrogen-fixing bacteria)

Асоціативні азотфіксатори (associative nitrogen-fixing bacteria)

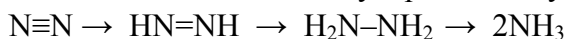
Діазотрофи, які вільно існують (free-living nitrogen-fixing bacteria)

Окиснення речовини (oxidation)

Відновлення речовини (reduction)

Біологічна фіксація азоту – процес зв'язування (відновлення) молекулярного азоту повітря азотфіксувальними мікроорганізмами та переведення його у форму, досяжну для інших організмів, у першу чергу, для вищих рослин. Фіксація азоту відбувається за участю ферментного комплексу – нітрогенази, який каталізує відновлення N_2 до NH_3 , при цьому джерелом енергії виступає АТФ. Нітрогеназа складається з двох компонентів Fe-білка та FeMo-білка, цей комплекс дуже чутливий до кисню та інактивується в його присутності.

Стадії відновлення молекулярного азоту:



Азотфіксувальні мікроорганізми – систематично гетерогенна група, до якої входять азотфіксатори, що вільно мешкають – спороутворювальні палички (*Bacillus*, *Clostridium*), метилотрофні бактерії (*Methylobacter*, *Methylococcus*), тіонові та сіркобактерії (*Thiobacillus*, *Beggiatoa*), деякі зелені та пурпурні бактерії, більшість ціанобактерій (гетероцисти), археї (*Methanlobus*, *Methanosarcina*); симбіотичні (бульбочкові) бактерії групи *Rhizobium*, а також асоціативні азотфіксатори – види родів *Azospirillum*, *Beijerinckia*, що мешкають на поверхні коренів вищих рослин.

7.1. Дослідження асоціативних азотфіксаторів і тих, що вільно мешкають

Представники групи азотобактерій (азотфіксатори, що вільно мешкають) – грамнегативні, хемоорганогетеротрофні, аеробні бактерії. Найбільш поширеними є види родів *Azotobacter* і *Azomonas*. Вони мають клітини паличковидної або овальної форми, в основному рухомі – перитрихи, монотрихи. Деякі представники азотобактерій здатні синтезувати полісахаридну капсулу, тому на твердих поживних середовищах формують слизові колонії. Бактерії роду *Azotobacter* можуть утворювати цисти (форми спокою) – структури, що виникають за рахунок появи додаткових слизових шарів навкруги клітин, і таким чином клітини стають стійкими до висушування. Трапляються азотобактерії переважно у нейтральних і лужних ґрунтах, а також у водоймах.

Серед асоціативних азотфіксаторів найбільш поширеними вважаються представники роду *Azospirillum* – потовщені вібріони або прямі короткі палички, часто з загостреними кінцями, переважно рухомі завдяки полярному джгутику, грамнегативні або грамваріабельні, аероби.

Виявлення азотобактерій у ґрунті методом обростання ґрунтових грудочок

Хід роботи

1. У стерильні чашки Петрі внести 10 мл розплавленого і охолодженого до температури 40–42°C середовища Ешбі.
2. Чашку Петрі закрити і дати середовищу повністю вихолонуть.
3. На поверхню агарової пластинки у чашці Петрі за допомогою профламованого пінцета та бактеріальної голки розкласти по 20–25 грудочок ґрунту, діаметр грудочки повинен бути приблизно 2–3 мм.
4. Чашки Петрі з розкладеними ґрунтовими грудочками заклеїти парафіном або плівкою та поставити у термостат за температури 30–32°C на 7 діб.
5. Через 7 діб спостерігати обростання слизовими колоніями азотобактерій ґрунтових грудочок.

Дослідження азотобактерій

Хід роботи

1. На добре знежирене предметне скло нанести невелику краплю метиленового синього барвника.
2. До барвника додати невелику кількість бактеріальної культури та ретельно перемішати за допомогою бактеріальної петлі.
3. За допомогою покривного скельця рідину розподілити по поверхні предметного скла й утворити тонкий мазок.
4. Препарат висушити при кімнатній температурі та мікроскопіювати з імерсійною системою.
5. Під мікроскопом на темному полі знайти майже незабарвлені кулясті клітини або диплококи. Незабарвлений шар навколо клітин – капсульна речовина, яка затримує барвник.
6. Зробити схематичні малюнки.

Дослідження азоспірил

Хід роботи

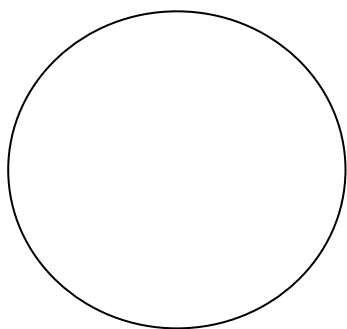
1. Виготовити мазок *Azospirillum brasilense*, висушити при кімнатній температурі та зафіксувати в полум'ї пальника.
2. Мазок забарвити фуксином протягом 2–3 хвилин.
3. Препарат промити водою, висушити фільтрувальним папером і мікроскопіювати з імерсією.
4. Знайти в полі зору товсті зігнуті клітини рожевого або червоного кольору.
5. Зробити схематичний малюнок.

7.2. Дослідження симбіотичних азотфіксаторів

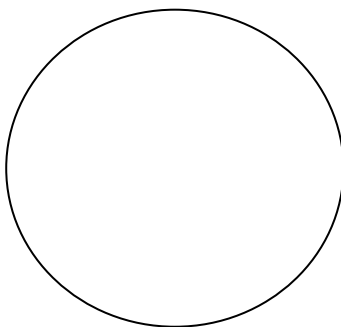
Бульбочкові бактерії – представники групи *Rhizobium*, здатні проникати в клітини кореня вищих рослин і викликати розростання тканин останнього (нодуляція), при цьому формується бульбочка, всередині якої і розвиваються бактерії. В результаті симбіотичних відносин бактерії отримують поживні речовини, а рослина – азот у досяжній формі (у вигляді амінокислот). Ризобії мають форму палички, рухомі, не утворюють спор, облігатні аероби, не здатні фіксувати азот поза межами бульбочки. Коренева бульбочка утворюється корневими клітинами, поживні речовини доставляються бактеріям по транспортній системі, сформованій судинами рослини, а всередині бульбочки розвиваються клітини ризобіїв, при цьому вони змінюють форму – стають V-, Y-подібними, перетворюючись на бактероїди. Бульбочкові бактерії виключно видоспецифічні, тобто здатні утворювати симбіоз з певним видом бобових рослин.

Хід роботи

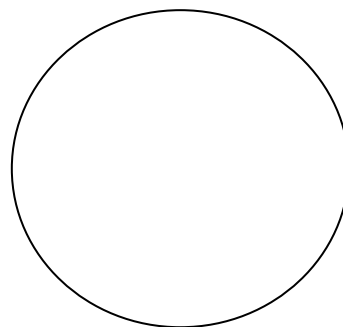
1. Виготовити мазок культури бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum*, висушити при кімнатній температурі та зафіксувати в полум'ї пальника.
2. Мазок забарвити метиленовим синім протягом 2–3 хвилин.
3. Препарат промити водою, висушити фільтрувальним папером і мікроскопіювати з імерсією.
4. Знайти в полі зору тонкі паличкоподібні клітини синьо-блакитного кольору.
5. Зробити схематичний малюнок.



Azotobacter sp.



Azospirillum brasilense



Bradyrhizobium japonicum

Контрольні питання

Які вчені виділили чисті культури досліджених вами діазотрофів?

Які процеси та речовини дають енергію для біологічної фіксації азоту?

Назвіть механізми захисту нітрогенази від окисної дії кисню.

Які форми азоту є доступними для рослин?

Який тип взаємовідносин формується між діазотрофами та рослинами? Чому?

Яким чином людина використовує діазотрофи у сільському господарстві?

ЗАНЯТТЯ 8. Амоніфікація та амоніфікуючі мікроорганізми.

Визначення чисельності мікроорганізмів чашковим методом Коха

Мікробіологічний словник:

Амоніфікація (ammonification)

Амоніфікатори (ammonification bacteria)

Дезамінування (deamination)

Гнилісні мікроорганізми (putrefactive microorganisms)

В оточуючому середовищі накопичується значна кількість залишків тваринного походження, які містять білкові сполуки, що є водонерозчинними, їх можуть «утилізувати» виключно мікроорганізми. Амоніфікація – це процес розкладання азотовмісних сполук (білків, нуклеїнових кислот та ін.) з утворенням аміаку. Це складний ферментативний процес, який починається з виділення мікроорганізмами в оточуюче середовище протеолітичних ферментів, які здійснюють гідроліз білків до полі-, олігопептидів, амінокислот. Далі пептиди потрапляють всередину клітин, де можуть дезамінуватися з утворенням аміаку, або декарбоксилуються з утворенням CO_2 та трупних отрут.

Амоніфікацію, або гниття, здійснюють в аеробних умовах (при цьому утворюються NH_3 , CO_2 , H_2O , H_2S , сульфати) або анаеробних (при цьому продукти розщеплення амінокислот не окиснюються і утворюються NH_3 , CO_2 , H_2S , органічні кислоти, аміни, спирти – індол, скатол) амоніфікуючі (гнилосні) мікроорганізми. Амоніфікатори – це гетерогенна група мікроорганізмів, до якої входять бактерії (представники родів *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Clostridium*), актинобактерії (види родів *Streptomyces*, *Nocardia*, *Micromonospora*), мікроміцети (роди *Mucor*, *Absidia*, *Aspergillus*, *Trichoderma* та ін.).

8.1. Визначення чисельності мікроорганізмів чашковим методом Коха

Цей метод є найбільш поширеним для визначення мікробного забруднення різних субстратів. Суть чашкового методу полягає в тому, що проводять посів певного об'єму досліджуваного матеріалу в чашки Петрі з твердим поживним середовищем. Вважається, що при подальшому вирощуванні посіву в термостаті внаслідок розмноження з кожної клітини утворюється одна колонія. Проте одна спора (конідія) також може дати ріст одній колонії, або фрагмент міцелію також може дати ріст одній колонії. Тому даний метод обмежено використовується для визначення чисельності мікроорганізмів, що утворюють міцелій або спори (конідії). Число колоній підраховують. Як поживне середовище для обліку бактерій застосовують м'ясопептонний агар, для підрахунку цвілевих грибів і дріжджів – сусло-агар або складні синтетичні середовища.

Робота за таким методом включає три етапи:

- приготування розведень;
- посів на тверде поживне середовище в чашки Петрі;
- підрахунок колоній, які вирости.

Приготування розведень. Чисельність мікроорганізмів в об'єктах зовнішнього середовища, як правило, велика, тому для отримання окремих колоній готують низку розведень досліджуваного субстрату. Розведення готують у стерильній водопровідній воді або фізіологічному розчині (0,9 % водний розчин NaCl), зазвичай використовують десятикратні послідовні розведення (1:10, 1:100, 1:1000 і т. д.).

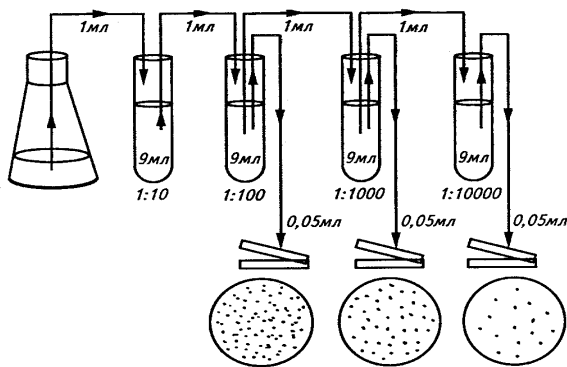


Рис. 6. Приготування послідовних розведень

залишилася на стінках піпетки, може потім потрапити в одне з подальших розведень, що і буде причиною отримання завищеного результату.

Посів на агаризовані середовища в чашки Петрі

У стерильні чашки Петрі наливають розплавлене на киплячій водяній бані агаризоване середовище, по 20–30 мл в кожену. Чашки залишають на горизонтальній поверхні, доки не захолоне агар. Потім їх витримують в термостаті при 30°C кришками донизу для підсихання поверхні середовища. Коли використовують елективні середовища або виділяють і враховують мікроорганізми, які вимагають підвищеної вологості, посів проводять відразу ж, або незабаром після застигання агару.

Посів проводять з певних розведень залежно від передбачуваного числа мікроорганізмів у досліджуваному субстраті. Стерильною піпеткою наносять певний об'єм (зазвичай 0,05, 0,1 або 0,2 мл) відповідного розведення, заздалегідь ретельно перемішаного, на поверхню агарової пластинки в чашці Петрі. Цей об'єм розподіляють по поверхні середовища стерильним шпателем Дригальського. Потім цим же шпателем проводять по всій поверхні в другій чашці, куди посівний матеріал не вносили. При виявленні мікроорганізмів, кількість яких в субстраті відносно невелика, посівний матеріал розподіляють по поверхні середовища тільки в одній чашці Петрі. Чашки із засіяним середовищем поміщають у термостат, відрегульований на певну температуру, сприятливу для розвитку мікроорганізмів, перевернувши їх догори дном.

Хід роботи

1. 1 г ґрунту помістити у колбу зі 100 мл стерильної води. Ретельно перемішати. Зробити розведення суспензії 1:10, 1:100, 1:1000.
2. Зробити висів 0,2 мл ґрунтової витяжки на поверхню твердого агаризованого середовища МПА.
3. Через 24 години підрахувати число колоній, які виросли на поверхні поживного середовища.
4. Розрахувати кількість бактерій у 1 г ґрунту.

8.2. Дослідження амоніфікуючих мікрорганізмів

При отриманні культури амоніфікаторів у середовищі найчастіше розвиваються спороутворювальні бактерії – *Bacillus mycoides*, *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *B. megatherium*, також можуть розвиватися факультативні анаероби – *Escherichia coli* та *Proteus vulgaris*.

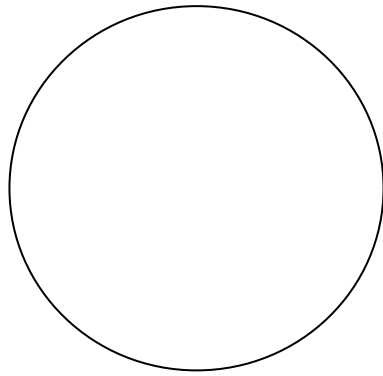
Хід роботи

1. Виготовити мазок із однієї колонії, яка виросла на середовищі МПА.
2. Мазок висушити та зафіксувати в полум'ї пальника.
3. Мазок зафарбувати диференціальним способом за Грамом.
4. Препарат мікроскопіювати з імерсійною системою. У препараті можна знайти грам-позитивні бацили та грамнегативні ешерихії та протеї.

5. Зробити схематичний малюнок.

Знайти у полі зору:

1. палички з закругленою, загостреною, обрубаною формами кінців клітини;
2. різні типи спороутворення.



Контрольні питання

За яких умов може протікати амоніфікація?

Які типи дезамінування вам відомі?

Який процес відбувається за участю уробактерій та які речовини при цьому утворюються?

Напишіть схеми різних шляхів амоніфікації.

1.

2.

3.

ЗАНЯТТЯ 9. Нітрифікація та нітрифікуючі мікроорганізми

Мікробіологічний словник:

Ніпрозобактерії (nitroso-bacteria)

Ніробактерії (nitro-bacteria)

Монооксигеназа (monooxygenase)

Гідроксиламіноксидоредуктаза (hydroxylamine oxidoreductase)

Нітритоксидаза (nitrite oxidase)

Нітрифікація – це процес окиснення амонійної форми азоту до нітритів і нітратів. До нітрифікації здатні як еукаріоти (грунтові мікроскопічні гриби), так і прокаріоти (нітрозозі і нітробактерії). Процеси нітрифікації, що здійснюють мікроміцети отримали назву гетеротрофної нітрифікації, оскільки гриби є гетеротрофами, а нітрифікуючі бактерії здійснюють автотрофну нітрифікацію. Автотрофну нітрифікацію здійснюють прокаріоти, об'єднані у фізіологічну групу нітрифікуючих бактерій. Даний процес вони використовують для отримання енергії, джерелом вуглецю для них виступає CO_2 . Нітрифікуючі бактерії – представники 7-ми родів з різною формою клітини – коки, палички, звивисті; рухомі й нерухомі; неспороутворювальні. Це облигатні аероби, що мешкають переважно у ґрунті. Нітрифікатори умовно поділяють на дві групи – представники першої, нітрозобактерії, належать до одного класу (роди *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus*, *Nitrospira*) здатні окиснювати аміак до нітритів. Представники другої групи, нітробактерії (*Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospina*), належать до трьох різних класів – виключно окиснюють нітрити до нітратів. Жоден вид нітрифікуючих бактерій не здатен окиснювати і аміак і нітрит.

9.1. Отримання накопичувальної культури нітрифікуючих бактерій

Для отримання накопичувальної культури нітрифікуючих бактерій необхідно додавати до поживного середовища азот у формі амонійного сполучення, яке є джерелом одержання енергії при окиснюванні його до нітратів.

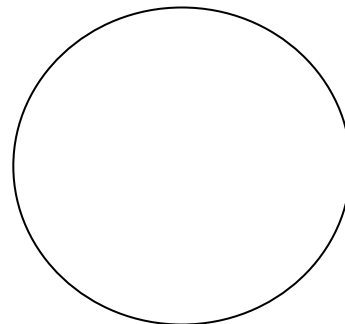
Хід роботи

1. У конічні колби з 50 мл поживного середовища для нітрифікуючих бактерій вносять невелику кількість ґрунту (приблизно $\frac{1}{2}$ чайної ложки).
2. Отриману ґрунтову суспензію ретельно перемішують протягом 1–2 хв.
3. Колби закривають ватно-марлевими пробками та ставлять у термостат при температурі 30°C на 14–21 добу.
4. Через 14 діб на поверхні рідини утворюється плівка, яку утворюють нітрифікуючі бактерії.

9.2. Дослідження нітрифікуючих бактерій

Хід роботи

1. На обезжирене скло нанести невелику краплю води і помістити в неї шматочок бактеріальної плівки з накопичувальної культури нітрифікуючих бактерій та ретельно розподілити по поверхні скла за допомогою бактеріальної петлі.
2. Мазок висушити на повітрі та зафіксувати у полум'ї пальника.
3. На фіксований мазок нанести кілька крапель метиленового синього на 2–3 хв.
4. Препарат ретельно промити водою, висушити та мікроскопіювати з імерсійною системою мікроскопа.
5. Знайти в полі зору блакитні палички, коки, скривлені палички.
6. Зробити схематичний малюнок.



Контрольні питання

Що являє собою процес нітрифікації?

Який тип живлення характерний для нітрифікаторів?

Який тип взаємовідносин характерний для нітрифікаторів першої та другої фази? Чому?

Заповніть таблицю:

Нітрифікуючі бактерії (нітробактерії та нітробактерії)	
Подібні ознаки	Відмінні ознаки

ЗАНЯТТЯ 10. Целюлозоруйнівні мікроорганізми

Мікробіологічний словник:

Целюлосома (cellulosome)

Целюлаза (cellulase)

Целобіаза (cellobiase)

Як відомо, на поверхні ґрунту та в його верхніх шарах міститься значна кількість рослинних залишків, а основним компонентом клітинних стінок рослин є целюлоза. Целюлоза виступає енергетичним і конструктивним матеріалом для чисельної групи мікроорганізмів – бактерій (клостридії, міксобактерії), актинобактерій, мікроскопічних грибів. Об'єднують їх ознакою є здатність до ферментативного розщеплення целюлози, яке мікроорганізми здатні виконувати як в аеробних, так і в анаеробних умовах. У присутності кисню целюлоза окислюється до CO_2 та H_2O , і цей процес протікає за участі одного організму. На відміну від аеробного окислення, в анаеробних умовах целюлоза окислюється до CO_2 та CH_4 , і до таких реакцій здатні синтрофні мікробні угруповання. Розщеплення целюлози каталізує комплекс ферментів, які можуть виділятися в оточуюче середовище (екзоферменти) або бути пов'язаними з бактеріальною клітиною і знаходитися всередині целюлосом (ендоферменти). Целюлосоми – спеціальні утворення на поверхні бактеріальної клітини та складаються з поліпептидних субодиниць (целюлозні ферменти) і вуглеводних фібрил.

10.1. Отримання накопичувальної культури аеробних целюлозоруйнівних мікроорганізмів

В аеробних умовах розщеплювати целюлозу здатні як еукаріотні мікроорганізми (мікроскопічні гриби родів *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Botrytis* та ін.), так і прокаріоти. Це актинобактерії родів *Streptomyces*, *Micromonospora* та бактерії – *Cytophaga* (довгі палички, злегка зігнуті, з загостреними кінцями), *Cellvibrio* (рухомі короткі, злегка зігнені палички), *Cellfalcicula* (короткі товсті палички з загостреними кінцями) та ін.

Хід роботи

1. У стерильні конічні колби ємністю 100–200 мл налити 50–100 мл простерилізованого рідкого середовища Гетчинсона.

2. У колбу внести 0,5–1 г ґрунту та на кінчику скальпеля – крейдяного порошку.
3. Із круглого листка фільтрувального паперу скласти складчастий конус і опустити на дно колби широкою стороною донизу.
4. Колбу закрити ватно-марлевою пробкою та поставити у термостат при температурі 25–26°C на 14 діб.

10.2. Дослідження целюлозоруйнівних мікроорганізмів

Через 14 діб уважно роздивитися колбу з накопичувальною культурою целюлозоруйнівних мікроорганізмів. Найбільш інтенсивно розщеплення фільтрувального паперу відбувалося на межі папір – рідина, де достатньо поживних речовин і кисню для розвитку аеробних мікроорганізмів. В результаті діяльності целюлозоруйнівних мікроорганізмів папір розпадається на окремі волокна, і конус осідає на дно, на самому папері неозброєним оком можна спостерігати слизові плями жовтуватого або рожевого кольору – результат розвитку мікроорганізмів.

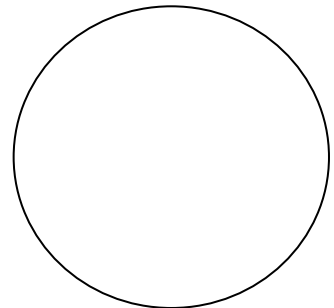
Хід роботи

1. За допомогою бактеріальної петлі взяти невелику кількість слизу або шматочок напіврозщепленого паперу та розмазати по предметному склу без додавання води.
2. Виготовлений таким чином мазок висушити та зафіксувати у полум'ї пальника.
3. Зафіксований препарат фарбувати фуксином впродовж 3–4 хвилин.
4. Препарат промити водою, висушити фільтрувальним папером і мікроскопіювати з імерсійним маслом.
5. Знайти в полі зору целюлозоруйнівні мікроорганізми різної морфології.
6. Зробити схематичні малюнки.

Контрольні питання

Напишіть реакцію розщеплення целюлози.

В яких умовах може відбуватися розщеплення целюлози?



Рисунок

Які ферменти беруть участь у розщепленні целюлози різними мікроорганізмами?

Які бактерії можуть входити до угруповань целюлозоруйнівних мікроорганізмів?

Що таке біла та бура гниль деревини? Які мікроорганізми є її збудниками?

Розщеплення целюлози целюлозо руйнівним угрупованням в умовах нестачі кисню закінчується утворенням CH_4 . Чому?

Узагальнююча таблиця «Деякі групи фото- и хемотрофних бактерій»

Назва групи	Особливості будови	Особливості життєдіяльності, тип живлення	Джерела енергії (донори та акцептори електронів)	Середовище існування	Представники
Фототрофні бактерії					
Ціанобактерії					
Пурпурні сіркові бактерії					
Пурпурні несіркові бактерії					

Зелені сіркові бактерії						
Зелені несіркові бактерії						
Геліобактерії						
Хемоотрофні бактерії (у тому числі облигатні та факультативні хемосинтетичні)						
Тіонові бактерії						

Нітрифікуючі бактерії		Залізобактерії

Карбокси- бактерії							
Водневі бактерії							
Інші хемотрофи							
Метилотрофи							
Денітрифі- куючі бактерії							
Сульфатре-							

дукуючі					
«Метало- хаючі» бактерії					<i>Geothrix fermentans</i> , <i>Geovibrio sp.</i> , <i>Deferribacter sp.</i>
Приклад заповнення					
Арсеніто- бактерії	Грамнегативні короткі палички, рухомі, моноотрихи. Належать до філії <i>Proteobacteria</i> домену <i>Bacteria</i> .	Факультативні хемоавтотрофи, здатні до гетеротрофії. Алкалофіли, галофіли та мезофіли. Анаероби або факультативні аероби (ріст при H_2), здатні окиснювати CO . Асимілюють CO_2 у циклі Кальвіна.	Донори електронів, т.б. вони окиснюють: Арсеніти – AsO_3^{3-} , водень – H_2 , сульфід S^{2-} , тіосульфати $S_2O_3^{2-}$. Акцептори e^- : Нітрати – NO_3^- . Кінцеві продукти: Арсенати, сульфати, нітрит.	Виділені з содових озер (наприклад, о. Моно, Каліфорнія, США), солоних морських вод, лиманів. Деякі представники знайдені у ґрунтах і прісних водоймах.	<i>Alkalilimnicola ehrlichii</i> <i>Pseudomonas arsenicoxidans</i> , <i>Halomonas sp.</i>

ЗАНЯТТЯ 11. Молочнокислі бактерії. Молочнокисле бродіння. Визначення вмісту молочної кислоти у молочних продуктах

Мікробіологічний словник:

Бактеріоцини (bacteriocin)

Нізин (nisin)

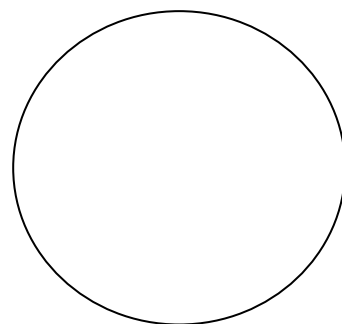
Фактори росту (growth factor)

Молочнокислі бактерії – фізіологічна група хемоорганогетеротрофних, неспро-
творювальних, нерухомих, факультативно анаеробних мікроорганізмів, збудників молоч-
нокислого бродіння. Трапляються у молоці та кисломолочних продуктах, в соліннях,
маринадах, у ґрунті, в філосфері та ризосфері рослин, в кишківнику хребетних. В результаті
зброджування цукрів (глюкоза, фруктоза, маноза, сахароза, лактоза, мальтоза та ін.)
утворюють молочну кислоту (гомоферментативне бродіння) або молочну, оцтову кислоти,
етанол, CO₂ (гетероферментативне бродіння). Особливою характеристикою молочнокислих
бактерій є їхня вибагливість до середовища – дані мікроорганізми потребують певних
екзогенних факторів росту (окремих амінокислот, вітамінів). Також представники групи
молочнокислих бактерій виключно чутливі до кисню, вони добре розвиваються за умов
відсутності або дуже низької концентрації кисню в середовищі.

11.1. Дослідження молочнокислих бактерій

Хід роботи

1. На предметне скло нанести краплю кисломолочного продукту або розсолу, додати краплю
дистильованої води та за допомогою бактеріальної петлі виготовити мазок.
2. Мазок висушити над полум'ям пальника та зафіксувати сумішшю Карнуа – кілька разів
суміш нанести на мазок і злити.
3. На фіксований таким чином мазок нанести кілька крапель
метиленового синього на 3–5 хв.
4. Препарат промити водою, висушити фільтрувальним папером
і мікроскопіювати з імерсійним маслом.
5. Знайти в полі зору ланцюжки коків або паличок.
6. Зробити схематичний малюнок.



11.2. Визначення вмісту молочної кислоти у молочних продуктах

Кількість молочної кислоти визначають за різницею 0,1 н NaOH, що було використано
для титрування молока у кінці досліду та на початку.

Хід роботи

1. У колбу внести 10 мл молока, додати 20 мл води та 2 краплі фенолфталеїну.
2. Титрувати 0,1 н NaOH до рожевого забарвлення.
3. Кислотність виражають у процентах молочної кислоти, або у градусах Тернера.
10⁰T – це 1 мл 0,1 н розчину лугу, який витрачено на титрування 100 мл молока.
4. Обчислюють вміст молочної кислоти:
– у градусах Тернера: $T = V_{NaOH} \cdot 10$
– у процентах молочної кислоти: $\text{лактат-\%} = V_{NaOH} \cdot 0,009$

Контрольні питання

Заповніть таблицю. Характеристика молочнокислих бактерій

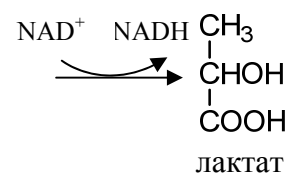
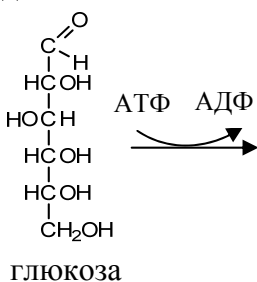
Характеристика	Гомоферментативні МКБ	Гетероферментативні МКБ
форма клітини		
спороутворення		
рухливість		
утворення капсули		
фарб. за Грамом		
представники		
екологія		

Заповніть таблицю. Характеристика молочнокислого бродіння

Характеристика	Гомоферментативне молочнокисле бродіння	Гетероферментативне молочнокисле бродіння
Рівняння реакції		
Які продукти утворюються		
Шлях катаболізму глюкози		Біфідобактерії
Кінцевий акцептор електронів		
Енергетичний вихід		

Перерахуйте спектр речовин, які зброджують гетероферментативні молочнокислі бактерії.

Використовуючи підручник, запишіть хімічні реакції анаеробного гліколізу від глюкози до молочної кислоти (11 реакцій), підпишіть назви сполук та ферментів.



ЗАНЯТТЯ 12. Оцтовокислі бактерії

Мікробіологічний словник:

Неповне окиснення (*incomplete oxidation*)

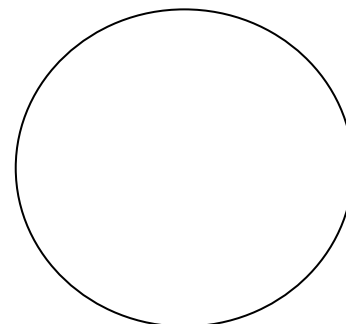
Алкогольдегідрогеназа (*alcohol dehydrogenase*)

До оцтовокислих бактерій належать роди хемоорганогетеротрофних, неспроутворювальних, зазвичай рухомих, облігатно аеробних мікроорганізмів, які отримують енергію завдяки окисненню первинних спиртів до карбонових кислот, зокрема, етанолу – до оцтової кислоти, а вторинних спиртів – до кетонів. Представники оцтовокислих бактерій – роди *Gluconobacter* (здатні окислювати етиловий спирт до оцтової кислоти, недоокиснювачі) і *Acetobacter* (швидко окиснюють етанол до оцтової кислоти, а потім кислоту повільно окиснюють далі, з виділенням CO₂, переокиснювачі). В природі трапляються на поверхні стиглих ягід або у повітрі, виступають забрудниками бродильних рідин. Особливістю оцтовокислих бактерій є здатність формувати капсули, які складаються з різних вуглеводів – декстрану, левану, целюлози. Залежно від складу капсульної речовини, бактерії утворюють різні за характеристиками біоплівки. Окрім того, за однакових умов фарбування йодом, клітини мають різний колір. Наприклад, у *Acetobacter aceti* клітини фарбуються йодом в жовтий колір, плівка гладенька, у *A. pasteurianum* – в синій, а плівка має сухий зморшкуватий вигляд. При наявності в бродильній речовині *A. xylinum* клітини також фарбуються в синій колір, але в рідині утворюється плівка, яка осідає на дно колби.

12.1. Дослідження оцтовокислих бактерій

Хід роботи

1. На предметне скло нанести краплю води, в неї за допомогою бактеріальної петлі перенести шматочок плівки з накопичувальної культури бактерій і зробити мазок.
2. Додати розчин Люголю, накрити покривним склом і через 10 хв мікроскопіювати з імерсійним маслом.
3. Знайти в полі зору забарвлені в жовтий або синій колір поодинокі палички, ланцюжки.
4. Зробити схематичний малюнок.



Контрольні питання

Напишіть сумарне рівняння окислювання етилового спирту до оцтової кислоти:

C₂H₅OH →

Оцтовокислі бактерії (р. <i>Gluconobacter</i> , р. <i>Acetobacter</i>)	
Подібні ознаки	Відмінні ознаки

Назвіть основні способи виготовлення оцту.

ЗАНЯТТЯ 13. Збудники спиртового бродіння. Спиртове бродіння

Мікробіологічний словник:

Піруватдекарбоксилаза (*pyruvate dehydrogenase*)

Субстратне фосфорилування (*alcohol dehydrogenase*)

Окисне (мембранне) фосфорилування (*oxidative phosphorylation*)

Відомо, що бродіння – це ферментативний окиснювально-відновлюваний процес перетворення органічних речовин, який протікає в анаеробних умовах та супроводжується синтезом молекул АТФ. Залежно від кінцевих продуктів розрізняють різні типи бродінь. При спиртовому бродінні, за участі різних мікроорганізмів, глюкоза перетворюється на етиловий спирт та CO₂. Спиртове бродіння використовується у мікробіологічних виробництвах для отримання різних продуктів – у хлібопекарстві, виноробстві, пивоварінні, при виробництві етилового спирту для фармацевтичної промисловості та потреб медицини, та ін. Отримувати енергію завдяки спиртовому бродінню здатні еукаріоти – найбільш відомі дріжджі (представники родів *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*) та менш відомі мукові гриби. Серед прокаріотів лише окремі представники бактерій здатні до спиртового бродіння – види *Sarcina ventriculi*, *Pseudomonas lindneri*, *Erwinia amylovora* та деякі інші.

13.1. Дослідження спиртового бродіння

Для дослідження можна використовувати будь-яку бродильну рідину – пиво, опару для тіста, фрукти, що забродили, культуральну рідину з накопичувальної культури пекарських дріжджів.

Хід роботи

1. У пробірку внести 10 мл бродильної рідини та додати 1–2 мл 10 % розчину NaOH.
2. Отриману суміш нагріти на водяній бані до температури 60°C.
3. До нагрітої суміші додати декілька кристалів йоду та знову нагріти. В присутності спирту випаде осад йодоформу, який має характерний запах.
4. Відзначити, в якій рідині було зафіксовано більш інтенсивне забарвлення.

Контрольні питання:

Напишіть загальну схему спиртового бродіння.

Які сполуки є донорами та акцепторами електронів в процесі спиртового бродіння?

Назвіть способи синтезу АТФ (способи фосфорилування).

Які білкові комплекси відповідають за синтез АТФ?

4. ЕКОЛОГІЯ ПРОКАРІОТ

ЗАНЯТТЯ 14. Мікробіота шкіри людини. Виділення мікроорганізмів з оточуючого середовища методом відбитків

Мікробіологічний словник:

Мікробіота (microbiota)

Мікобіота (micobiota)

Автохтонна мікробіота (autochthonous(indigenous) microbiota)

Алохтонна мікробіота (allochthonous (transient) microbiota)

Біоплівки (biofilm)

Дифтеріїди (diphtheroids)

На поверхні шкіри людини, на слизових оболонках, у відкритих порожнинах людини мешкає понад 10^{13} клітин мікроорганізмів. Популяції цих організмів складають нормальну мікробіоту (аутобіоту) людського організму. Розрізняють автохтонну, постійну мікробіоту та транзиторну, випадкову – алохтонну. Мікроорганізми, завдяки взаємодії своїх поверхневих структур з протеїнами мембран макроорганізму, формують біоплівки й таким чином виконують функцію протиінфекційного захисту людини. Кожній частині організму людини притаманна своя мікробіота. Оскільки шкіра є відкритою екосистемою, саме тут можна знайти найбільшу кількість алохтонних мікроорганізмів. До складу постійної нормальної мікробіоти шкіри входять різні коки – *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. intermedius*, а також бревібактерії, коринебактерії та дифтеріїди. Окрім того, на поверхні шкіри можна знайти аеробні спороутворювальні палички (р. *Acinetobacter*), які мешкають у повітрі, воді, ґрунті. Більша кількість мікроорганізмів трапляється в місцях концентрації сальних і потових залоз. Співвідношення груп мікроорганізмів залежить від віку, статі, стану імунної системи людини.

14.1. Дослідження мікробіоти шкіри людини методом відбитків

Мікробіоту поверхні шкіри людини можна дослідити методом змивів і методом відбитків. При використанні першого методу стерильною ватою, змоченою стерильним фізіологічним розчином, протирають поверхню шкіри, нігті, потім вату переносять у пробірку з напіврідким живильним середовищем, ретельно перемішують, і через годину невеликий об'єм такої суспензії з дотриманням умов стерильності переносять на тверде живильне середовище у чашках Петрі. Чашки витримують протягом доби у термостаті при температурі 36°C, а потім ще 2–3 доби витримують при кімнатній температурі. Метод відбитків вважається експрес-методом, він достатньо простий у виконанні та не потребує певних навичок техніки мікробіологічних досліджень.

Хід роботи

1. На водяній бані розплавити тверде живильне середовище МПА.
2. Із дотриманням стерильності приблизно 10 мл охолодженого до 40-45°C МПА внести у стерильну чашку Петрі та залишити до повного застигання.
3. Із дотриманням стерильності легко притиснути палець до поверхні агарової пластинки у чашці Петрі.

4. Засіяні таким чином чашки Петрі поставити у термостат при температурі 35–36 °С.
5. На наступному лабораторному занятті дослідити культурально-морфологічні ознаки колоній мікроорганізмів, які вирости на МПА у чашках Петрі.

14.2. Дослідження культурально-морфологічних ознак бактерій

Морфологічні ознаки. До них належать форма та розміри бактеріальної клітини, наявність чи відсутність капсул, слизу, джгутиків, забарвлення за Грамом, здатність до спороутворення.

Культуральні ознаки. До них належать здатність мікроорганізмів рости на тому чи іншому живильному середовищі, а також характеристика колоній, які вирости на твердому живильному середовищі (наприклад, МПА). Дослідження проводять за допомогою мікроскопа МБС-9.

1. Форма колонії.

2. Профіль колонії.

3. Край колонії.

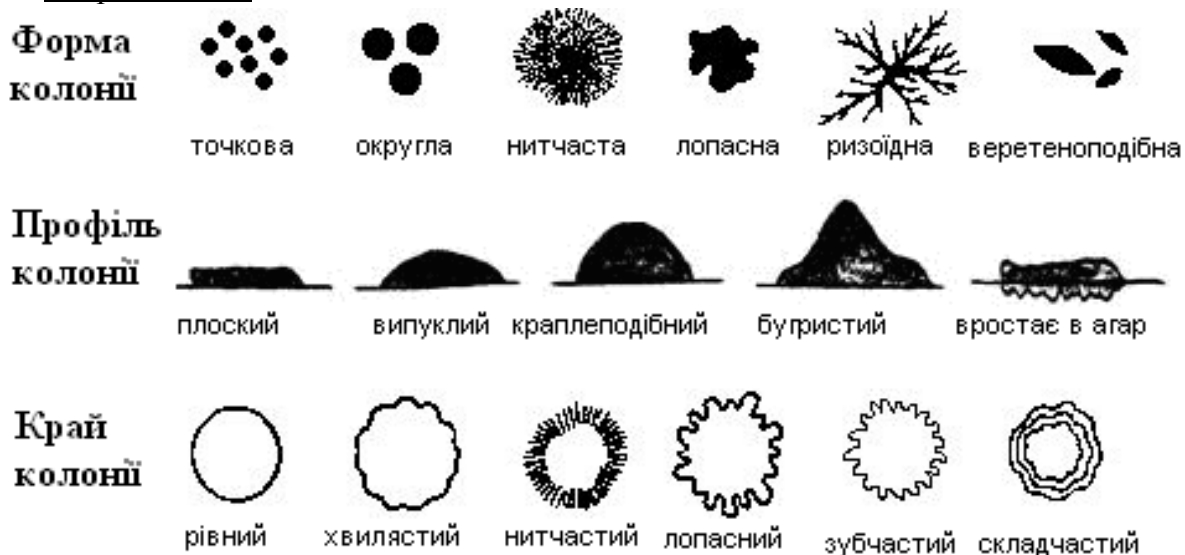


Рис. 8 Морфологія колонії

4. Розмір колонії – вимірюється лінійкою, виражається в мм. Колонія діаметром 10 мм і більше – велика за розміром, діаметром 1–10 мм – середня, якщо колонія має розмір близько 1 мм, її вважають точковою. Розмір дуже дрібних колоній (менше 1 мм) визначають за допомогою окуляр-мікрометра.

5. Колір колонії і колір оточуючого агару – прозора, безкольорова, забарвлена. Забарвлення колоній визначають за допомогою шкали кольорів; якщо мікроорганізми виділяють пігмент в середовище, визначають і його колір. Іноді мікроорганізми мають забарвлений в інший колір реверзум (зворотна сторона колонії).

6. Структура колонії – однорідна, дрібнозерниста, крупнозерниста; нитчаста (визначається за допомогою бактеріальної петлі).

Хід роботи

1. За допомогою мікроскопа МБС-9 визначити культуральні ознаки бактеріальної колонії.
2. За допомогою шкали кольорів визначити колір колонії.
3. Виготовити мазок мікроорганізмів та забарвити за Грамом.

4. Результати визначення культуральних ознак бактеріальної колонії та її морфології занести до лабораторного журналу.

1. Культуральні ознаки:

Форма колонії

Профіль колонії

Край колонії

Розмір колонії

Колір колонії і колір оточуючого агару

Структура колонії

2. Морфологічні ознаки:

Форма клітини

Агрегація клітин

Розмір клітини

Наявність ендоспор

3. Тинкторіальні ознаки

Забарвлення за Грамом

4. Попереднє визначення виду

Контрольні питання

Назвіть принципи фенетичної класифікації прокаріот.

Назвіть принципи філогенетичної класифікації прокаріот.

Які мікроорганізми є представниками мікроценозу верхніх дихальних шляхів людини?

Які мікроорганізми є представниками мікроценозу травного тракту людини?

Які фактори впливають на чисельність та склад мікроорганізмів травневого тракту людини?

Назвіть можливі причини дисбіозу. Які шляхи його подолання?

Які взаємовідносини складаються між людиною та мікроорганізмами? Наведіть приклади.

ЗАНЯТТЯ 15. Мікробіота повітря

Мікробіологічний словник:

Загальне мікробне число (*common microbial counts*)

Колонієутворююча одиниця – КУО (*colony-forming unit – CFU*)

Інсоляція (*insolation*)

Повітря є такою екологічною нішою для мікроорганізмів, в якій вони не розмножуються, а тільки підтримують своє існування деякий час. Це пов'язано з відсутністю у повітрі поживних речовин та постійною зміною складу повітряних мас. Склад мікрофлори повітря є достатньо динамічним, постійно змінюється та оновлюється. Мікрофлору повітря умовно поділяють на резидентну, яка формується переважно ґрунтовими мікроорганізмами і більш-менш постійно знаходиться у повітрі, та тимчасову, тобто таку, що висівається із повітря спорадично. До складу резидентної мікрофлори зазвичай входять бактерії *Micrococcus roseus*, *M. flavus*, *M. candidam*, *Sarcina flava*, *S. alba*, *S. rosea*, *Bacillus subtilis*, *B. mycoides*, *B. mesentericus*, види роду *Actinomyces*, мікроміцети родів *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* та ін. різні види дріжджів. Більшість цих мікроорганізмів мають ліпофільні властивості клітинних покривів та синтезують різні пігменти, які захищають їх від надмірної інсоляції.

Тимчасова мікрофлора повітря формується також за рахунок ґрунтових видів, але також до її складу входять мікроорганізми з водойм, з поверхні шкіри тварин, а у повітрі поблизу біовиробництв можуть траплятися види, які використовуються на цих виробництвах. До складу тимчасової мікрофлори повітря приміщень можуть входити умовно-патогенні та патогенні види мікроорганізмів та віруси, усі вони потрапляють туди з поверхні шкіри людини, а також при чханні, кашлі або просто під час розмови.

Санітарними службами постійно проводиться моніторинг мікрофлори як атмосферного повітря, так і повітря приміщень різного призначення. В першу чергу визначають загальне мікробне число (ЗМЧ, ОМЧ – рос.). В закритих приміщеннях повітря вважається чистим за умов вмісту в 1 м³ не більше 1500 колоній-утворювальних одиниць (КУО, КОЕ – рос.). Регулярне провітрювання та вологе прибирання знижує чисельність мікроорганізмів у повітрі у 30 разів.

16.1. Дослідження мікрофлори повітря приміщень

Для дослідження мікрофлори повітря використовують спеціальні прилади, через які пропускається певний об'єм повітря, а всі мікроорганізми осідають на фільтри (з них роблять змиви), або відразу на тверді поживні середовища у чашки Петрі. Також можна використовувати седиментаційний метод Коха.

Хід роботи

1. Використовувати чашки Петрі із застиглими поживними середовищами МПА, Чапека, Сабуро. Відкриті чашки Петрі витримати на поверхні стола, підлоги, або на полицях протягом 5 хв. Підраховано, що за цей час осідає стільки клітин мікроорганізмів, скільки міститься у 10 л повітря.

2. Чашки Петрі закрити кришками та поставити у термостати при температурі 37°C (для дослідження бактерій) і 22°C (для дослідження мікроміцетів) на 7 діб.

3. Через 7 діб підрахувати кількість колоній, що вирости за допомогою приладу для підрахунку колоній бактерій.

4. Визначити число КУО у 1 м³ повітря за формулою:

$$X_2 = ((X_1 \times 100) / 78,5) \times 100,$$

де X_1 – число колоній, які вирости на чашці Петрі; 78,5 – площа чашки Петрі.

5. Результати визначення культуральних ознак бактеріальної колонії та її морфології занести до лабораторного журналу.

1. Культуральні ознаки:

Форма колонії

Профіль колонії

Край колонії

Розмір колонії

Колір колонії і колір оточуючого агару

Структура колонії

2. Морфологічні ознаки:

Форма клітини

Агрегація клітин

Розмір клітини

Наявність ендоспор

3. Тинкторіальні ознаки

Забарвлення за Грамом

4. Попереднє визначення виду

Контрольні питання

Чому у забрудненому повітрі чисельність мікроорганізмів значно більша, ніж у чистому?

Назвіть способи зменшення чисельності мікроорганізмів у повітрі?

Які мікроорганізми є найбільш небезпечними у повітрі лікарні?

ТЕМИ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТІВ

Історія розвитку мікробіології

1. Життя та діяльність Антонія Ван Левенгука.
2. Роль досліджень Луї Пастера у розвитку мікробіології.
3. Вклад у розвиток мікробіології Едуарда Дженера й Александра Флемінга.
4. Досліди Роберта Коха в галузі медичної мікробіології.
5. Роботи С. М. Виноградського та Мартіна Бейєрінка в галузі ґрунтової мікробіології.
6. Вклад в розвиток мікробіології російських вчених – І. І. Мечникова, В. М. Шапошнікова, Г. А. Надсона.
7. Капілярні методи дослідження мікроорганізмів – роботи М. Г. Холодного, Б. В. Перфільєва, Д. Р. Габе.
8. Мікробіологія на межі XX–XXI століть – основні відкриття та напрями досліджень.

Особливості систематики та класифікації мікроорганізмів

1. Історична довідка про перші спроби класифікації мікроорганізмів.
2. Принципи класифікації мікроорганізмів.
3. Нумерична систематика бактерій М. Адансона.
4. Філогенетична систематика бактерій.

Узагальнююча таблиця «Вклад деяких вчених у розвиток мікробіології»

Роки діяльності	Персона (кирилицею)	Персона (латиною)	Основний вклад у розвиток мікробіології (вивчення прокаріот)
		<i>Friedrich August Johannes Loeffler</i>	
		<i>John Tyndall</i>	
		<i>Ch.E. Chamberland</i>	
		<i>Pierre Paul Émile Roux</i>	
		<i>Roger Steiner</i>	
		<i>Robert Edward Hungate</i>	
	Ернст Августин Дюшене	<i>Ernst Augustin Duchesnay</i>	
	Зинаида Ермольєва		
		<i>Gerhard Johannes Paul Domagk</i>	
		<i>Selman Abraham Waksman</i>	
		<i>Jules Jean-Baptiste Vincent Bordet</i>	

Життєві цикли бактерій, особливості розвитку популяцій мікроорганізмів

1. Способи спороутворення у прокаріот.
2. Життєві цикли різних груп бактерій та актинобактерій.
3. Фази розвитку бактеріальної популяції.

Особливості взаємовідносин мікроорганізмів в природі

1. Коменсалізм у мікроорганізмів.
2. Синтрофізм у мікроорганізмів.
3. Паразитизм у мікроорганізмів.
4. Приклади хижацтва у мікроорганізмів.
5. Антагоністичні взаємовідносини між різними групами мікроорганізмів.
6. Використання мікроорганізмів у виготовленні бактеріальних добрив.

Участь мікроорганізмів у кругообігу речовин у природі

1. Роль мікроорганізмів у кругообігу азоту.
2. Роль мікроорганізмів у кругообігу сірки.
3. Роль мікроорганізмів у кругообігу вуглецю.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА (для самостійної роботи студента)

1. Андреев Е. И. Основы экологии почвенных микроорганизмов / Е. И. Андреев, Е. В. Валагурова. – К. : Наук. думка, 1992. – 221 с.
2. Антипчук А. Ф. Водна мікробіологія / А. Ф. Антипчук, І. Ю. Кіреєва. – К. : Нац. Аграрн. ун-т, 2003. – 256 с.
3. Бабий Т. П. Биологи. Библиографический справочник / под. ред. Т. П. Бабий, Л. Л. Коханова. – К. : Наук. думка, 1984. – 816 с.
4. Билай В. И. Победители невидимых. Из истории микробиологии / В. И. Билай. – М. : Учпедгиз, 1959. – 150 с.
5. Вавилин В. А. Моделирование деструкции органического вещества сообществом микроорганизмов / В. А. Вавилин, В. Б. Васильев, С. В. Рытов. – М. : Наука, 1993. – 179 с.
6. Г. де Кюри. Охотники за мікробами / Г. де Кюри. – М. : Наука, 1987.
7. Гарвей, Дженнер, Кювье, Пирогов, Вирхов: Биографические повествования. – Челябинск: Урал LTD, 1998. – 399 с.
8. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002. – 589 с.
9. Громов Б. В. Экология бактерий / Б. В. Громов. – М. : Высшая школа, 1984. – 246 с.
10. Гусев М. В. Микробиология / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. – М. : Academia, 2007. – 462 с.
11. Заварзин Г. А. Становление системы биогеохимических циклов / Г. А. Заварзин // Палеонтологический журнал. – 2003. – № 6. – С. 16–24.
12. Заварзин Г. А. Лекции по природоведческой микробиологии / Г. А. Заварзин. – М. : Наука, 2004. – 348 с.
13. Заварзин Г. А. Развитие микробных сообществ в истории Земли. Проблемы доантропогенной эволюции биосферы / Г. А. Заварзин. – М. : Наука, 1993. – С. 212–222.
14. Заварзин Г. А. Введение в природоведческую микробиологию: Учебное пособие / Г. А. Заварзин, Н. Н. Колотилова. – М. : Книжный дом «Университет», 2001. – 256 с.
15. Звягинцев Д. Г. Биология почв / Д. Г. Звягинцев, И. П. Бабьева, Г. М. Зенова. – М. : МГУ имени М. В. Ломоносова, 2005. – 445 с.
16. Имшенецкий А. А. Луи Пастер. Жизнь и творчество / А. А. Имшенецкий. – М. : Изд-во АН СССР, 1961. 72. с.
17. История биологии с начала XX века и до наших дней / под ред. Л. Я. Бляхера – М. : Наука, 1975. – 660 с.
18. Кожевин П. А. Микробные популяции в природе / П. А. Кожевин. – М. : Изд-во МГУ, 1985. – 175 с.
19. Козлова І. П. Геохімічна діяльність мікроорганізмів та її прикладні аспекти: Навч. посібник / І. П. Козлова, О. С. Радченко, Л. Г. Степура, Т. О. Кондратюк, А. І. Піляшенко-Новохатний. – К. : Наук. думка, 2008. – 528 с.
20. Кондратьева Е. Н. Автотрофные прокариоты / Е. Н. Кондратьева – М. : Изд-во МГУ, 1996. – 312 с.
21. Лысак В. В. Микробиология: учеб. пособие для студентов биологических специальностей / В. В. Лысак. – Минск: БГУ, 2007. – 343 с.
22. Малашенко Ю. Р. Биология метанобразующих и метанооксиляющих микроорганизмов / Ю. Р. Малашенко, Ю. Хайер, В. Бергер, В. А. Романовская. – К. : Наук. думка, 1993. – 255 с.

23. Моруа А. Жизнь Александра Флеминга / А. Моруа. – М.: Изд-во иностранной литературы, 1961. – 336 с.
24. Нетрусов А. И. Общая микробиология / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. – М. : Academia, 2007. – 283 с.
25. Паников Н. С. Кинетика роста микроорганизмов / Н. С. Паников. – М. : Наука, 1991. – 311 с.
26. Протисты /под ред. А. Ф. Алимова. – М. : Наука, 2000–2007.
27. Современная микробиология. Прокариоты: в 2 т. / под ред. Й Ленгелер, Г. Древе и Г. Шлегель. – М. : Мир, 2005.
28. Шаталкин А. И. Высший уровень деления в классификации организмов. 2. Археобактерии, эубактерии и эукариоты / А. И. Шаталкин // Журн. общ. биологии. – 2004. – Т. 65, № 2 – С. 99–115.
29. Щелкунов С. Н. Генетическая инженерия / С. Н. Щелкунов. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. – 304 с.
30. Экология микроорганизмов / под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Изд. центр “Академия”, 2004. – 272 с.
31. Яновская М. И. Роберт Кох (1843–1910)/М.И. Яновская. –М.: Молодая гвардия, 1962. – 272 с.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

(для підготовки до семестрових та підсумкового контролю)

Основна

1. Гусев М. В. Микробиология / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. – М. : Academia, 2007. – 462 с.
2. Кондратьева Е. Н. Автотрофные прокариоты / Е. Н. Кондратьева. – М. : Изд-во МГУ, 1996. – 312 с.
3. Нетрусов А. И. Общая микробиология / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. – М. : Academia, 2007. – 283 с.
4. Пиневиц А. В. Микробиология. Биология прокариотов: учебник. В 3 т / А. В. Пиневиц. – СПб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2007, 2009.
5. Современная микробиология. Прокариоты: в 2 т. / под ред. Й Ленгелер, Г. Древе и Г. Шлегель. – М. : Мир, 2005 .
6. Экология микроорганизмов / под ред. А.И. Нетрусова. – М. : Изд. центр «Академия», 2004. – 272 с.

Допоміжна

1. Андреюк Е. И. Основы экологии почвенных микроорганизмов / Е. И. Андреюк, Е. В. Валагурова. – К. : Наук. думка, 1992. – 221 с.
2. Вавилин В. А. Моделирование деструкции органического вещества сообществом микроорганизмов / В. А. Вавилин, В. Б. Васильев, С. В. Рытов. – М. : Наука, 1993. – 179 с.
3. Звягинцев Д. Г. Биология почв / Д. Г. Звягинцев, И. П. Бабьева, Г. М. Зенова. – М. : МГУ имени М.В. Ломоносова, 2005. – 445 с.
4. Заварзин Г. А. Лекции по природоведческой микробиологии / Г. А. Заварзин. – М. : Наука, 2004. – 348 с.
5. Козлова І. П. Геохімічна діяльність мікроорганізмів та її прикладні аспекти: навч. посібник / І. П. Козлова, О. С. Радченко, Л. Г. Степура, Т. О. Кондратюк, А. І. Піляшенко-Новохатний. – К. : Наук. думка, 2008. – 528 с.

6. Микробиология, вирусология и иммунология / под ред. В.Н. Царева. – М. : Практическая медицина, 2009. – 584 с.
7. Сергійчук М. Г. Будова бактеріальної клітини та методи її дослідження / М. Г. Сергійчук. – К.: Фітосоціоцентр, 2001. – 232 с.
8. Шлегель Г. Общая микробиология / Г. Шлегель. – М. : Мир, 1989. – 567 с.

ІНФОРМАЦІЙНІ РЕСУРСИ

1. <http://www.membrana.ru>
2. <http://www.elementy.ru>
3. <http://www.eLIBRARY.ru>
4. <http://www.window.edu.ru>

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

до загального курсу «Мікробіологія»

Розділ 1

1. Роль вітчизняних вчених у розвитку мікробіології (роботи І. І. Мечнікова, С. М. Виноградського, Б. В. Перфільєва та інших).
2. Роль зарубіжних вчених у розвитку мікробіології (роботи А. Левенгука, Л. Пастера, Р. Коха, Е. Дженера, А. Флемінга та інших). Постулати Р. Коха.
3. Методи стерилізації. Дезінфекція.
4. Капілярні методи вивчення мікроорганізмів.
5. Принципи систематики мікроорганізмів. Системи Р. Стенієра та К. Воза.
6. Морфологічні типи прокаріотів та морфологія бактеріальної клітини.
7. Особливості організації прокаріотної клітини: бактерії та археї.
8. Структура та функції пептидоглікану, ліпополісукриду та тейхоевих кислот.
9. Будова клітинних покривів грампозитивних та грамнегативних бактерій.
10. Будова та функції цитоплазматичної мембрани, поверхневого S-шару, блебінг-везикул.
11. Будова та функції периплазматичного компартменту, контактів Байєра, целюлосом.
12. Структура та функції нуклеїду, нуклеїдосом, бактеріальних плазмід.
13. Структура та функції клітинних стінок прокаріот.
14. Будова та функції капсул, чохлів, слизових утворень та стебелець.
15. Структура та функції трубчастих утворень, шипів, газових балонів.
16. Структура та функції рибосом, шаперонінів, протеасом, деградосом.
17. Будова та функції рапідосом, аеросом, карбоксисом.
18. Будова та функції вакуолей, магнітосом, анаммоксисом.
19. Структура та функції хлоросом, хроматофорів, тилакоїдів, фікобілісом.
20. Характеристика клітинних включень: поліфосфати, полігідроксиалканоати, поліглюкозидні гранули, ціанофіцинові гранули, параспоральні тільця.
21. Типи рухливості у бактерій.
22. Будова, функції, механізм руху поверхневих та периплазматичних джгутиків.
23. Будова та функції стебелець і фімбрій (пілей).
24. Спороутворення у бактерій: ендоспори, екзоспори.
25. Типи поділу прокаріот, механізм бінарного поділу у бактерій (*E. coli*).

Розділ 2

26. Археї: особливості метаболізму та екології.
27. Метаногени, метаногенез.
28. L-форми бактерій.
29. Мікоплазми.
30. Рикетсії.
31. Хламідії.
32. Актинобактерії.
33. Фази розвитку бактеріальної популяції.
34. Особливості розвитку популяції гіфальних мікроорганізмів.
35. Автотрофність і гетеротрофність. Джерела живлення та енергії.
36. Особливості фотосинтезу у бактерій.
37. Бактеріохлорофіли.

38. Каротиноїди бактерій. Фікобіліпротеїди.
39. Галоархеї. Бактеріородопсин, робота протонної помпи.
40. Пурпурні бактерії та еритробактерії.
41. Зелені бактерії та геліобактерії.
42. Ціанобактерії та прохлорофіти.
43. Сіркобактерії, тіонові бактерії, сульфатредукуючі бактерії.
44. Нітрифікуючі бактерії.
45. Водневі бактерії.
46. Групи залізобактерій.
47. Карбоксидобактерії та метилотрофні бактерії.
48. Оцтовокислі бактерії та виробництво оцту.
49. Процеси амоніфікації та амоніфікуючі мікроорганізми.
50. Мікроорганізми, які руйнують целюлозу.

Розділ 3

51. Бродіння. Загальна характеристика.
52. Двофазність бродіння.
53. Маслянокисле та ацетонбутилове бродіння, характеристика їх збудників.
54. Гомо- і гетероферментативні молочнокислі бактерії.
55. Шляхи використання молочнокислих бактерій.
56. Спиртове бродіння. Виробництво спирту, пивоваріння і виробництво вина.
57. Мурашинокислотне (змішане) та бутандіолове бродіння.
58. Пропіоногенез та ацетогенез (ацетатне та гомоацетатне бродіння).
59. Бульбочкові азотфіксуючі бактерії: морфологія та фізіологія, механізм проникнення.
60. Азотфіксуючі мікроорганізми, що вільно існують.
61. Асоціативні азотфіксатори та PGPR-група бактерій.
62. Азотфіксуючі симбіози рослин, грибів та тварин з ціанобактеріями.
63. Бактеріальні добрива.
64. Механізм фіксації молекулярного азоту.
65. Участь мікроорганізмів у кругообігу азоту.
66. Участь мікроорганізмів у кругообігу вуглецю.
67. Участь мікроорганізмів у кругообігу сірки.
68. Коменсалізм у мікроорганізмів.
69. Синтрофізм та хижацтво у мікроорганізмів.
70. Антагонізм і паразитизм у мікроорганізмів.
71. Трансформація у бактерій.
72. Трансдукція у бактерій: загальна, специфічна, абортівна.
73. Методи пеніцилінового добору та відбитків.
74. Кон'югація у бактерій.
75. Використання прокаріотів у генній інженерії.

ВИМОГИ ДО НАПИСАННЯ КУРСОВОЇ РОБОТИ

- Курсова робота обсягом 10–15 сторінок формату А4 повинна бути написана від руки.
- Титульна сторінка курсової роботи оформлюється за загальноприйнятими правилами.
- Курсова робота повинна включати такі розділи: вступ, основна частина (може бути розділена на розділи та підрозділи), узагальнення (або висновки). Також необхідно скласти зміст та список використаної літератури.
- У тексті курсової роботи в квадратних дужках необхідно вказувати посилання на порядковий номер джерела літератури, без вказівки процитованих сторінок.
- При написанні курсової роботи необхідно використати не менше 10 джерел літератури, з яких 3 статті (бажано іноземних).
- При написанні курсової роботи допускається використання інтернет-ресурсів, за умови правильного оформлення посилань, але це не повинно бути єдиним джерелом інформації.
- Роботу необхідно здавати на перевірку в одному файлі.

ОРІЄНТОВНИЙ ПЕРЕЛІК ТЕМ ДЛЯ НАПИСАННЯ КУРСОВОЇ РОБОТИ

1. Кінетика та фізіологія росту бактеріальної популяції та популяції гіфальних мікроорганізмів.
2. Мікробіологічні технології.
3. Археї. Особливості будови, екологія, використання в біотехнологіях.
4. Облігатні паразити – хламідії та рикетсії, особливості будови, фізіології, розмноження.
5. Особливості бактеріального фотосинтезу. Бактеріальні пігменти фотосинтезу – характеристика, локалізація.
6. Характеристика фототрофних бактерій – особливості будови, фізіології, роль в природі.
7. Характеристика фізіологічних груп бактерій із хемотрофним способом життєдіяльності.
8. Бродіння. Загальна характеристика. Типи бродіння – спиртове, молочнокисле, маслянокисле, пропіонове, ацетон-бутилове. Використання збудників даних типів бродіння у промисловості.
9. Аеробні процеси, що здійснюють амоніфікатори. Загальна характеристика даних груп мікроорганізмів, роль в природі.
10. Оцтовокисле бродіння чи неповне окиснення? Загальна характеристика оцтовокислих бактерій, особливості їхньої фізіології. Промислове отримання оцту.
11. Мікроорганізми, що руйнують целюлозу, хітин, лігнін в аеробних і анаеробних умовах. Характеристика даних груп мікроорганізмів, роль в природі.
12. Мікроорганізми, що беруть участь у кругообігу азоту. Характеристика даних груп, місце в природі.
13. Мікроорганізми, що беруть участь у кругообігу сірки. Характеристика даних груп, місце в природі.
14. Мікроорганізми, що беруть участь у кругообігу вуглецю. Характеристика даних груп, місце в природі.
15. Мінливість мікроорганізмів. Характеристика трансформації, трансдукції, кон'югації. Використання даних процесів у біотехнології.

ПРАВИЛА ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ ПРИ РОБОТІ У МІКРОБІОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

1. Забороняється заходити до лабораторії у верхньому одязі.
2. Робота у лабораторії дозволяється тільки у халаті.
3. Під час роботи на столі повинні знаходитися тільки речі, необхідні для виконання лабораторної роботи.
4. На кожному занятті за чистоту та порядок відповідає черговий.
5. Відчиняти вікна тільки з дозволу викладача.
6. Забороняється приносити і вживати напої та продукти.
7. Вмикати та вимикати тумблери на електричному щитку тільки з дозволу викладача.
8. Під час роботи з обладнанням та оптичними приладами, у випадках виявлення несправностей приладів, електропроводки, тощо необхідно повідомити викладача.
9. Під час виготовлення препаратів необхідно уважно працювати з барвниками, фіксаторами, газовими пальниками.
10. При виконанні роботи необхідно уважно читати підписи на пробірках з культурами мікроорганізмів, склянках з барвниками та фіксуючими рідинами.
11. Склянки з барвниками та фіксаторами, бактеріальні петлі повинні знаходитися у штативах, коли вони не використовуються у роботі.
12. Після закінченню заняття уважно прочитати пам'ятку з прибирання робочого місця та виконати усі пункти.

ЗМІСТ

ВСТУП	3
1. ОСНОВИ МІКРОСКОПІЧНОЇ ТЕХНІКИ	4
2. ПРИНЦИПИ ОРГАНІЗАЦІЇ ТА ОСОБЛИВОСТІ РОБОТИ В МІКРОБІОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ	
Заняття 1. Структура мікробіологічної лабораторії. Живильні середовища для виращування мікроорганізмів. Стерилізація та дезінфекція.....	6
2. ЦИТОЛОГІЯ ПРОКАРІОТ	
Заняття 2. Морфологія бактерій. Виготовлення фіксованих забарвлених мікробіологічних препаратів	12
Заняття 3. Грампозитивні та грамнегативні бактерії	15
Заняття 4. Генетичний апарат бактеріальної клітини	18
Заняття 5. Клітинні включення мікроорганізмів	21
Заняття 6. Рухливість бактерій. Капсули. Ендоспори бактерій	23
3. ФІЗІОЛОГІЧНІ ГРУПИ ПРОКАРІОТ	
Заняття 7. Біологічна фіксація азоту й азотфіксатори	29
Заняття 8. Амоніфікація та амоніфікуючі мікроорганізми. Визначення чисельності мікроорганізмів чашковим методом Коха.....	32
Заняття 9. Нітрифікація та нітрифікуючі мікроорганізми.....	34
Заняття 10. Целюлозоруйнівні мікроорганізми	36
Заняття 11. Молочнокислі бактерії. Молочнокисле бродіння. Визначення вмісту молочної кислоти у молочних продуктах	43
Заняття 12. Оцтовокислі бактерії	45
Заняття 13. Збудники спиртового бродіння. Спиртове бродіння	41
4. ЕКОЛОГІЯ ПРОКАРІОТ	
Заняття 14. Мікробіота шкіри людини. Виділення мікроорганізмів з оточуючого середовища методом змивів та відбитків.....	47
Заняття 15. Мікрофлора повітря	50
ТЕМИ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТІВ.....	52
РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА	58
КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ.....	61
ВИМОГИ ДО НАПИСАННЯ КУРСОВОЇ РОБОТИ	63
ОРІЄНТОВНИЙ ПЕРЕЛІК ТЕМ ДЛЯ НАПИСАННЯ КУРСОВОЇ РОБОТИ	63
ПРАВИЛА ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ ПРИ РОБОТІ У МІКРОБІОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ.....	64

Навчальне видання

Віннікова Ольга Іванівна
Раєвська Ірина Миколаївна

ПРАКТИКУМ З МІКРОБІОЛОГІЇ

*Методичні рекомендації
для студентів 2 курсу денного відділення біологічного факультету*

Коректор *О. В. Пікалова*
Комп'ютерне верстання *Н. О. Ваніна*
Макет обкладинки *І. М. Дончик*

Формат 60×84/8. Ум. друк. арк. 5,2. Тираж 100 пр. Зам. № 145/16.

Видавець і виготовлювач
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

61022, м. Харків, майдан Свободи, 4.
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 3367 від 13.01.2009
Тел. 705-24-32